

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 MALATTIE DEL SANGUE

**DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE
XX CICLO**

**STUDIO PROSPETTICO NELLA LMC Ph+: LA FISH E'
EFFICACE QUANTO LA CITOGENETICA
CONVENZIONALE PER LA DEFINIZIONE DELLA
RISPOSTA AL TRATTAMENTO CON IMATINIB.
CORRELAZIONE CON LA RISPOSTA MOLECOLARE**

TESI DI DOTTORATO

Presentato da Dott.ssa Giulia Marzocchi

**Coordinatore
Chiar.mo Prof. Stefano A. Pileri**

**Relatore
Dott.ssa Nicoletta Testoni**

Esame finale anno 2008

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Le sindromi mieloproliferative	3
1.2 La Leucemia Mieloide Cronica	4
1.3 Laboratorio	6
1.4 Prognosi	6
1.5 Il cromosoma Philadelphia	7
1.6 La p210 ^{BCR-ABL} : ruolo patogenetico	11
1.7 Traslocazioni varianti del cromosoma Philadelphia	15
1.8 Alterazioni aggiuntive al cromosoma Philadelphia	17
1.8.1 Evoluzione Clonale	20
1.9 FISH	21
1.10 La terapia della Leucemia Mieloide Cronica	22
1.10.1 La terapia convenzionale	22
1.10.2 Il trapianto di cellule staminali allo geniche	22
1.10.3 L'Interferone- α ricombinante	23
1.10.4 L'Imatinib mesilato	24
1.11 Tecniche di monitoraggio e definizione dei criteri di risposta	29
2. OBIETTIVO DELLO STUDIO	32
3. MATERIALI E METODI	33
3.1 Protocollo LMC 021-022-023	33
3.2 Analisi citogenetica convenzionale	34

3.3	Tecnica di bandeggio cromosomico	35
3.3.1	Bandeggio GTG	36
3.4	Metodica FISH	37
3.4.1	Sonde utilizzate	38
3.5	Metodica RQ-PCR	42
3.6	Statistica	45
4.	RISULTATI	46
5.	DISCUSSIONE	56
6.	BIBLIOGRAFIA	62

1. INTRODUZIONE

1.1 Le sindromi mieloproliferative

Le sindromi mieloproliferative sono neoplasie del sistema emopoietico caratterizzate dall'alterata produzione di cellule mieloidi, mature o immature.

Tali neoplasie possono originare da una cellula staminale già orientata verso la linea mieloide. Più spesso, però, la cellula staminale colpita dall'evento neoplastico, è multipotente e non ancora orientata: in questi casi, è il fenotipo esclusivo della neoplasia ad essere mieloide, anche se nel suo decorso possono insorgere caratteristiche linfoidi (1).

Le sindromi mieloproliferative possono essere distinte in acute, subacute e croniche; tale distinzione è riferita al decorso e alla durata della malattia. In particolare, le sindromi mieloproliferative croniche sono caratterizzate da un clone neoplastico costituito da cellule che maturano e differenziano come la controparte normale.

In base al tipo di cellule mieloidi proliferanti è possibile distinguere:

- *Leucemia Mieloide Cronica*: eccesso di precursori a cellule mature della granulocito poiesi;
- *Trombocitemia Essenziale*: eccesso di megacariociti e piastrine;
- *Policitemia Vera*: eccesso di eritroblasti e eritrociti.

1.2 La Leucemia Mieloide Cronica.

La leucemia mieloide cronica (LMC) rappresenta la sindrome mieloproliferativa cronica meglio studiata dal punto di vista biologico e costituisce un modello di riferimento per patologie analoghe.

La LMC è caratterizzata dall'aumentata espansione clonale della linea granulocitaria con trasformazione o evoluzione (quasi) obbligata in leucemia acuta.

Il decorso clinico della LMC si articola in tre fasi: fase cronica, fase accelerata e crisi blastica.

Durante la fase cronica, della durata di circa 3-5 anni, si assiste all'espansione clonale della popolazione leucemica, ancora in grado di differenziarsi normalmente.

Con il progredire della malattia, la cellula leucemica perde la capacità di maturare. Si passa quindi ad uno stadio intermedio (fase accelerata, FA) in cui i pazienti mostrano segni di progressione, senza però avere ancora caratteristiche di leucemia acuta. Tale fase è caratterizzata da: progressiva anemizzazione, riduzione o aumento delle piastrine, leucocitosi con alterazione della formula leucocitaria a causa dell'aumento dei precursori della granulocitopoiesi.

All'esame biptico, il midollo osseo può mostrare segni di fibrosi e crescenti aggregati di blasti. Possono comparire segni clinici quali: astenia, febbre, dimagrimento, sudorazioni profuse notturne, dolori ossei e muscolari.

Quando la percentuale di blasti in circolo è superiore al 10% o quando quella dei blasti midollari è superiore al 50%, allora la malattia mostra le caratteristiche di sindrome mieloproliferativa acuta, con accumulo di blasti trasformati, bloccati ad uno stadio precoce di differenziamento. Tale fase è nota come crisi blastica (CB).

La LMC è una malattia relativamente rara, con un'incidenza di 1-1,5 casi/100.000 abitanti l'anno, rappresentando il 15-20% delle leucemie.

Il picco d'incidenza si colloca tra la 5^a e la 6^a decade di età con un rapporto maschio/femmina di 1,4:1. E' rara nel bambino.

La diagnosi è occasionale in circa il 30% dei pazienti. I sintomi, quando presenti, sono generici e di modesta entità. Essi possono essere distinti in due gruppi:

1. sintomi dipendenti dall'espansione della massa granulocitaria e piastrinica, legati quasi esclusivamente all'aumento di volume nella milza;
2. sintomi in parte causati dall'anemizzazione e in parte generici: astenia, calo ponderale, febbre o febbre di basso grado, dolori ossei e muscolari, sudorazioni profuse notturne.

I segni clinici della malattia, all'esame obiettivo, sono scarsi e si riassumono con splenomegalia (notevole nel 40% dei casi) dovuta a metaplasia mieloide dell'organo. Epatomegalia significativa è presente in meno del 10% dei casi.

1.3 Laboratorio

L'esame emocromocitometrico e morfologico del sangue periferico è fondamentale per l'orientamento diagnostico. Esso mostra una leucocitosi, variabile da poche migliaia di leucociti per mm^3 a centinaia di migliaia, con una formula leucocitaria caratteristica per la presenza e per la prevalenza di tutte le cellule della linea granulocitaria, in proporzione crescente dal mieloblasto al granulocito maturo. Il numero delle piastrine è normale in 2/3 dei casi, aumentato in un 1/3 dei casi. Un'anemia (normocitica o normocromica, in parte da ridotta formazione di eritrociti e in parte da eritropoiesi inefficace) è presente in 1/3 dei casi in forma lieve; in forma marcata nel 10% dei casi.

L'esame citologico (per aspirato) e istologico (per biopsia) del midollo osseo mostra un quadro di marcata ipercellularità con iperplasia di tutta la granulopoiesi e, in molti casi, anche della megacariocitopoiesi. Questi aspetti midollari della LMC, benché relativamente caratteristici, non sono mai assolutamente diagnostici.

La diagnosi deve obbligatoriamente includere la dimostrazione dell'alterazione cromosomica $t(9;22)$ e/o molecolare (riarrangiamento BCR-ABL), caratteristica della malattia.

1.4 Prognosi

Molti elementi clinici hanno valore prognostico, ma bastano pochi fattori (età, dimensione della milza, numero delle piastrine e percentuale dei blasti nel sangue periferico) per calcolare il rischio relativo e l'aspettativa di vita del paziente, secondo una formula elaborata da Sokal, et al. (2).

1.5 Il cromosoma Philadelphia

La leucemia mieloide cronica (LMC) è caratterizzata dalla presenza di un cromosoma di piccole dimensioni, definito *cromosoma Philadelphia (Ph)* (Fig.1).

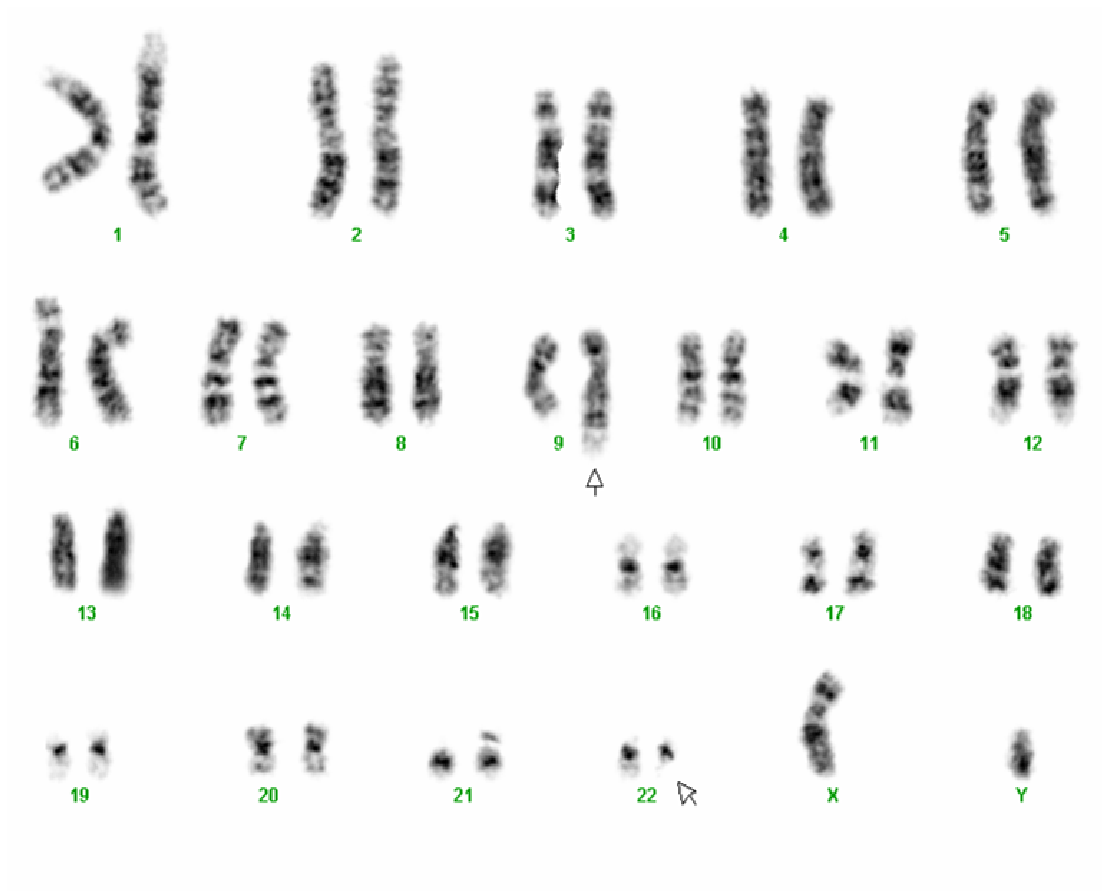


Figura1: Cariotipo 46,XY,t(9;22)(q34;q11).

Prende il nome dalla città in cui fu scoperto nel 1960 da Nowell e Hungerford (3) e, solo in seguito, nel 1973, Rowley dimostrò come esso fosse la risultante di una traslocazione reciproca e bilanciata tra i bracci lunghi dei cromosomi 9 e 22, con breakpoints rispettivamente q34 e q11: $t(9;22)(q34;q11)$ (Fig.2) (4).

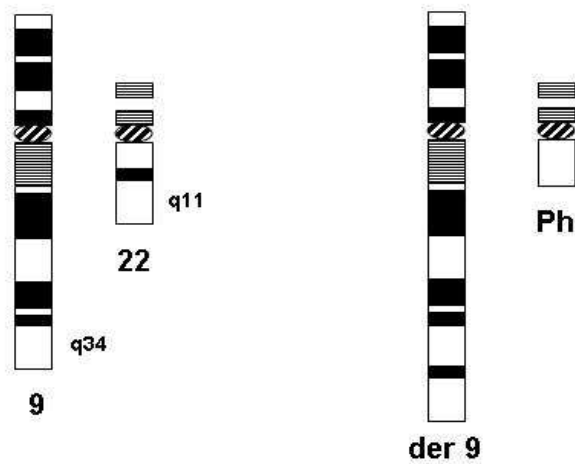


Figura 2: Traslocazione (9;22)(q34;q11); a sinistra i cromosomi 9 e 22 normali; a destra il cromosoma 9 derivativo e il cromosoma di Philadelphia (cromosoma 22 derivativo).

Per molti anni, il cromosoma Philadelphia è stata la sola anomalia citogenetica conosciuta associata ad una specifica patologia umana maligna.

Negli anni successivi, sono state chiarite le basi molecolari della LMC: la conseguenza della $t(9;22)(q34;q11)$ è la traslocazione del gene ABL (localizzato sul cromosoma 9) sul cromosoma 22 in corrispondenza del gene bcr (*breakpoint cluster region*), a formare un gene ibrido di fusione BCR-ABL. La tirosinchinasi ABL wild type è localizzata parzialmente nel nucleo ed ha regolazione ad attività chinastica; il risultato della fusione BCR-ABL è una tirosinchinasi citoplasmatica costitutivamente attiva che non blocca il differenziamento, ma induce la proliferazione e la viabilità delle cellule della linea mieloide (5).

Il punto di rottura sul cromosoma 9 è stato localizzato, nella maggior parte dei pazienti, in una sequenza intronica di 300 Kb tra gli esoni 1a, 1b e 2, mentre sul cromosoma 22 all'interno del gene BCR, formato da 23 esoni, i breakpoints possono interessare più regioni, con conseguente formazione di almeno tre distinti geni di fusione codificanti per proteine a diverso peso molecolare che risultano essere associati a tre diverse forme di leucemie (5):

- *p190*: punto di rottura sul cromosoma 22 fra gli esoni e1-e2 (Minor Breakpoint Cluster region, m-bcr), associata al 20-30% delle leucemie linfoblastiche acute (LAL);
- *p210*: punto di rottura tra gli esoni b1-b5 (Major Breakpoint Cluster region, M-bcr, circa 5.8 Kb), associata al 90% delle LMC;
- *p230*: con punto di rottura tra gli esoni e19-e20 (zona di rottura centromerica rispetto a M-bcr), associata ad un sottogruppo di pazienti con leucemia cronica neutrofila (LCN) (Fig.3).

Non è chiaro se le differenze nelle attività delle tre proteine rendono conto della loro associazione a diversi fenotipi della malattia o se l'espressione di ogni proteina avviene in una distinta linea emopoietica. È stato dimostrato che l'aumento della lunghezza della porzione di BCR nella proteina di fusione è

correlata a una diminuzione dell'attività tirosinchinasica di ABL: di conseguenza la p230 mostra un'attività tirosinchinasica più bassa rispetto a p210 e p190, e a sua volta p210 ha attività inferiore a p190.

Gli oncogeni BCR-ABL differiscono per la porzione di BCR inclusa: tale caratteristica nella struttura potrebbe essere la causa delle loro caratteristiche biologiche e quindi della diversa malattia clinica associata ad ognuna. È possibile che i breakpoints in BCR che determinano p190 possano avvenire in maniera preferenziale nelle cellule B immature, mentre quelli che determinano p210 avvengano nelle cellule staminali (6).

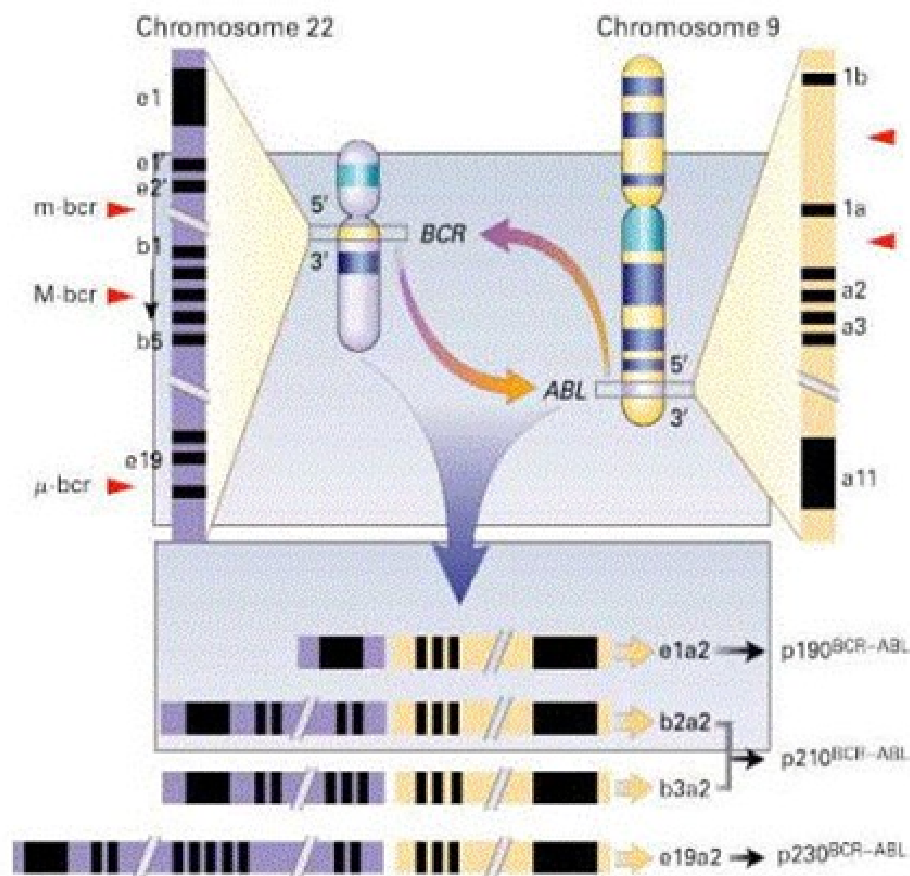


Figura 3: t(9,22) e formazione dei differenti trascritti chimerici.

Il cromosoma Philadelphia è individuato nel 95% dei casi di leucemia mieloide cronica alla diagnosi. Nel rimanente 5% dei casi, che non presentano cromosoma Philadelphia all'analisi citogenetica, viene individuato il riarrangiamento BCR-ABL con tecniche di FISH e di biologia molecolare. In questi casi di LMC Ph-negative possono avvenire probabilmente meccanismi più complessi, tra cui l'inserzione del riarrangiamento BCR-ABL dal cromosoma 22 al cromosoma 9, successiva alla t(9;22) iniziale. Per questi motivi l'alterazione non è visibile con analisi di citogenetica convenzionale.

Non è stato chiarito quali siano i meccanismi in grado di favorire la traslocazione. Una tra le ipotesi proposte prevede la presenza di siti fragili in corrispondenza dei punti di rottura sul DNA.

Secondo un'altra ipotesi, invece, sarebbe la distribuzione spaziale dei cromosomi 9 e 22 prima dell'allineamento in metafase che, comportando la vicinanza dei geni ABL e BCR, potrebbe favorire una ricombinazione illegittima. L'analisi delle sequenze fiancheggianti i punti di rottura non ha, tuttavia, rilevato la presenza di sequenze ripetute potenzialmente favorevoli le traslocazioni (7).

1.6 La p210^{BCR-ABL}: ruolo patogenetico

Per comprendere appieno i meccanismi attraverso i quali il gene ibrido BCR-ABL si rende responsabile dell'induzione neoplastica è necessario analizzare la funzione fisiologicamente svolta dai due geni coinvolti nella traslocazione (8).

Il gene ABL, più estesamente studiato, codifica per una proteina tirosinchinasica di 145 KDa indispensabile per la regolazione della progressione nel ciclo cellulare e per la traduzione di alcuni segnali, mediati dalle integrine, provenienti dall'ambiente extra-cellulare. Tramite legame con la p53, la p145^{ABL}, che ha localizzazione prevalentemente nucleare, induce un blocco proliferativo in fase G1/S necessario per consentire la riparazione di eventuali danni del DNA o l'innescio dell'apoptosi. Il gene ABL è espresso a bassi livelli virtualmente in tutte le cellule dell'organismo. Nella p145^{ABL}, oltre al dominio funzionale ad attività tirosinchinasica (SH1), esistono alcuni siti funzionali ad attività regolatoria (SH2 ed SH3, rispettivamente potenziante ed inibente l'attività tirosinchinasica) ed una regione C-terminale capace di interagire con sequenze di DNA. Quest'ultima regione è capace di legare la f-actina ed altre proteine cellulari.

Meno nota è la funzione della proteina di 160 KDa codificata dal gene BCR, espresso attivamente in molti citotipi. Questa proteina, che si localizza esclusivamente a livello citosolico, può modificare la propria conformazione sterica tramite legame con GTP/GDP ed è in grado di formare omotetrameri in vitro. Essa presenta all'estremo N-terminale un dominio di oligomerizzazione, capace di legare sequenze omologhe, ed un dominio dotato di attività serina/treoninachinasica con funzione fisiologica non nota.

La formazione della proteina ibrida p210^{BCR-ABL} porta ad una alterazione strutturale di alcuni dei siti regolatori di queste proteine (9-15):

- l'attività tirosin-kinasica di ABL, normalmente presente soprattutto a livello nucleare, viene trasferita in modo prevalente nel citoplasma e costitutivamente attivata, sia a causa della perdita della azione inibitoria del dominio SH3, sia attraverso la oligomerizzazione mediata dal dominio N-terminale di BCR con conseguente autofosforilazione in siti multipli;

- la configurazione spaziale di alcuni domini di BCR si modifica, rendendoli disponibili al legame con proteine che attivano vie diverse di traduzione del segnale coinvolgenti RAS, STAT, JAK-1, JUN, MYC e PIP3-kinasi;
- aumenta in modo significativo l'affinità del dominio C-terminale di ABL per la f-actina, rispetto alla p145^{ABL}.

Queste alterazioni conferiscono alla p210^{BCR-ABL} un'elevata attività tirosinchinasica, che ha un ruolo centrale nel processo leucemogenetico poiché è in grado di mantenere una emopoiesi Ph-positiva e di indurre la progressione attraverso 4 meccanismi principali (9-15):

1. modificano la capacità di adesione dei progenitori mieloidi sia allo stroma, con aumento della loro dismissione nel sangue periferico, sia alla matrice extra-cellulare, con perdita del controllo che essa esercita sulla proliferazione. Le cellule Ph-positive presentano una disregolazione della traduzione del segnale mediata dal sistema integrinico e sono caratterizzate da una iperfosforilazione di Crkl, proteina coinvolta nei processi di adesione attraverso l'associazione con altri fattori tra cui la paxillina;
2. causano l'attivazione di segnali mitogenici. Il sistema RAS è coinvolto sia in maniera diretta, tramite la sua fosforilazione, che indirettamente, tramite la fosforilazione di substrati intermedi (Shc, Crkl). Il coinvolgimento del sistema JAK-STAT è stato dimostrato in numerose linee cellulari Ph-positive. I due sistemi, RAS e JAK-STAT, rendono la cellula Ph-positiva indipendente dai fattori di crescita;
3. determinano instabilità genomica. L'aumentata proliferazione avviene a spese della fase G0/G1 e comporta probabilmente l'abolizione del punto di controllo G1/S, cruciale per la riparazione di eventuali danni del DNA prima della replicazione del genoma. Questo potrebbe favorire l'acquisizione delle ulteriori anomalie genotipiche che sembrano avere un ruolo importante nella progressione alla fase accelerata/blastica. Secondo

un'altra ipotesi, l'instabilità genomica potrebbe essere pre-esistente alla comparsa del cromosoma Ph. Da un punto di vista citogenetico, le alterazioni più frequenti che si accompagnano alla progressione sono la trisomia dell'8, l'isocromosoma 17, la duplicazione del Ph e la trisomia del 19. Sono state, inoltre, descritte numerose mutazioni inattivanti i geni codificanti per proteine ad attività onco-soppressiva come p53, p16, pRb;

4. inibiscono la morte cellulare programmata (apoptosi) in modo strettamente dipendente dall'attivazione di RAS. Il meccanismo d'azione non è ancora perfettamente compreso, ma l'attività della proteina chimerica è necessaria per le cellule Ph-positive, che vanno incontro ad apoptosi in seguito ad inibizione della proteina p210^{BCR-ABL}.

L'omeostasi della cellula staminale emopoietica colpita dall'evento trasformante subisce profonde modifiche, che comportano l'espressione di un fenotipo cellulare leucemico. La cellula staminale Ph-positiva mantiene inizialmente la capacità differenziativa, realizzando la tipica iperplasia granulocitica caratteristica della fase cronica della malattia. Al tempo stesso, tuttavia, il clone leucemico inizia a subire una serie di danni genetici ulteriori i quali, nel loro insieme, determineranno una progressiva perdita delle capacità differenziative con evoluzione alla fase terminale (8-17).

1.7 Traslocazioni varianti del cromosoma Philadelphia

Nella maggior parte dei pazienti affetti da LMC, il cromosoma Ph è il risultato di una traslocazione reciproca tra i cromosomi 9 e 22.

È stato osservato, però, che in una percentuale compresa tra il 5 e il 10%, tale alterazione si origina da traslocazioni varianti, nelle quali possono venire coinvolti fino a 5 cromosomi (Fig.4)

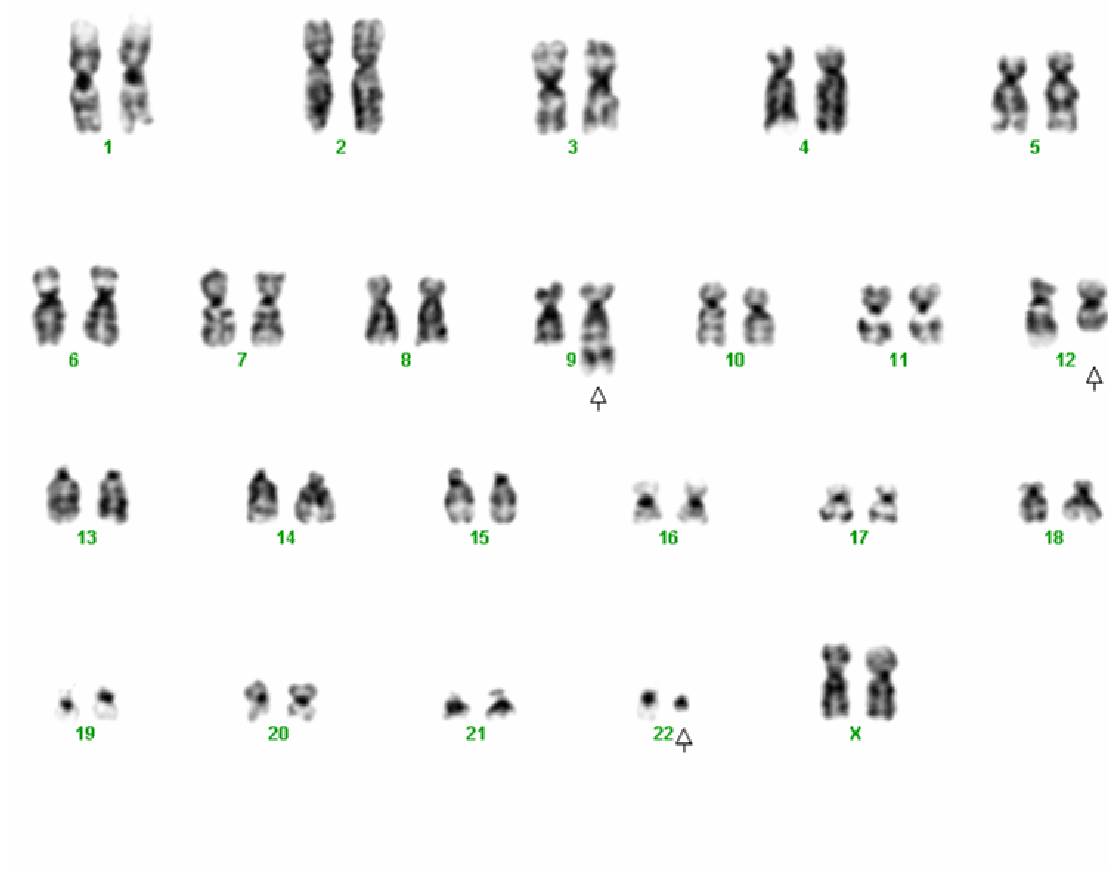


Figura 4: Traslocazione variante del cromosoma Ph 46,XX, t(9;12;22)(q34;q15;q11).

Sono state riconosciute due forme di traslocazioni varianti:

- semplice: in cui il segmento perso dal 22q è traslocato in un cromosoma diverso dal 9. Quest'ultimo, quindi, non sarebbe coinvolto nella traslocazione;
- complessa: dove, oltre ai cromosomi 9 e 22 ne vengono coinvolti altri (in numero da 1 a 3).

Inizialmente, si pensava che nelle traslocazioni varianti semplici, il cromosoma 9 non fosse per niente coinvolto. In realtà, da analisi di citogenetica molecolare, si è osservato che anche in esse si viene a formare il gene chimerico di fusione BCR-ABL. Si dimostrava in questo modo che anche tali traslocazioni in realtà sono determinate da fenomeni complessi (18).

Il fatto che esse, all'analisi citogenetica, mostrino entrambi i cromosomi 9 normali è probabilmente causato dalla porzione che trasloca dal cromosoma 22, la quale essendo molto telomerica, è minima, per cui difficilmente rilevabile.

L'ibridazione in situ fluorescente (FISH) ha permesso di caratterizzare in maniera più completa le traslocazioni varianti.

Si è innanzitutto osservato come ci siano alcune bande cromosomiche più frequentemente coinvolte: 1p, 11q23, 12p13 e 17q25 (19).

Molti studi sono stati condotti per capire i meccanismi attraverso cui si originano le traslocazioni varianti: quelle complesse potrebbero nascere da un unico evento; tuttavia, una minoranza di esse potrebbe essere il risultato di una serie di traslocazioni. Con l'utilizzo della FISH è stato osservato che, nel 53% dei casi, queste ultime si formano per molteplici rotture e fusioni.

La più forte evidenza a dimostrazione dell'ipotesi di molteplici riarrangiamenti, deriva dalla rara osservazione di pazienti che presentano un clone con traslocazione classica insieme ad un altro con riarrangiamento variante. In FISH è stato dimostrato che la traslocazione variante complessa deriva da quella classica ed è il risultato di steps successivi, allontanando, quindi, l'idea di un'evoluzione indipendente dei due cloni.

Quando l'origine di traslocazioni varianti è il risultato di una serie di riarrangiamenti, essa avviene in rapida sequenza. A dimostrazione di ciò è l'assenza di un clone con t(9;22) classica nella maggior parte dei pazienti LMC con traslocazione variante.

La prognosi dei pazienti con traslocazioni varianti non sembra essere significativamente diversa da quella di pazienti con traslocazione classica. Dato i molteplici coinvolgimenti cromosomici delle traslocazioni varianti, è probabile che la sopravvivenza nei pazienti che le presentano sia il risultato di molteplici interazioni. Infatti, nei riarrangiamenti varianti potrebbero venire coinvolti oncogeni o geni soppressori in grado di fornire una prognosi peggiore e geni che non sono cruciali nella proliferazione cellulare. Questi pazienti, quindi, presentano alterazioni che possono conferire una cattiva prognosi insieme ad alterazioni che invece ne possono conferire una migliore: il risultato può essere un equilibrio che determina una prognosi pressoché uguale a pazienti con traslocazione semplice t(9;22) (19-20).

1.8 Alterazioni aggiuntive al cromosoma Philadelphia

Se da una parte il riarrangiamento BCR-ABL è considerato la causa patogenetica della LMC, dall'altro l'acquisizione di anomalie citogenetiche e molecolari aggiuntive è probabilmente responsabile della progressione della malattia.

L'insorgenza di anomalie cromosomiche in aggiunta al cromosoma Philadelphia viene definita come *evoluzione clonale (EC)* citogenetica. Tali anomalie conferiscono un fenotipo più aggressivo alla malattia.

Le alterazioni aggiuntive possono essere già presenti alla diagnosi (7-8% dei casi); più frequentemente, però, compaiono durante la progressione, da pochi

mesi prima fino al momento della trasformazione acuta della malattia. È stato osservato che il 60-80% dei pazienti con LMC in crisi blastica presentava una EC (7,8).

Tre sono le alterazioni più frequentemente osservate nei quadri di evoluzione clonale: la *trisomia del cromosoma 8* (Fig.5) presente nel 34% dei casi con alterazioni addizionali, la *duplicazione del cromosoma Ph* nel 30% dei casi, l'*isocromosoma 17q* nel 20% dei casi. Poiché tali alterazioni cromosomiche compaiono, nel loro insieme, in più dell'80% dei pazienti con evoluzione clonale, esse vengono definite come “vie evolutive maggiori” (21).

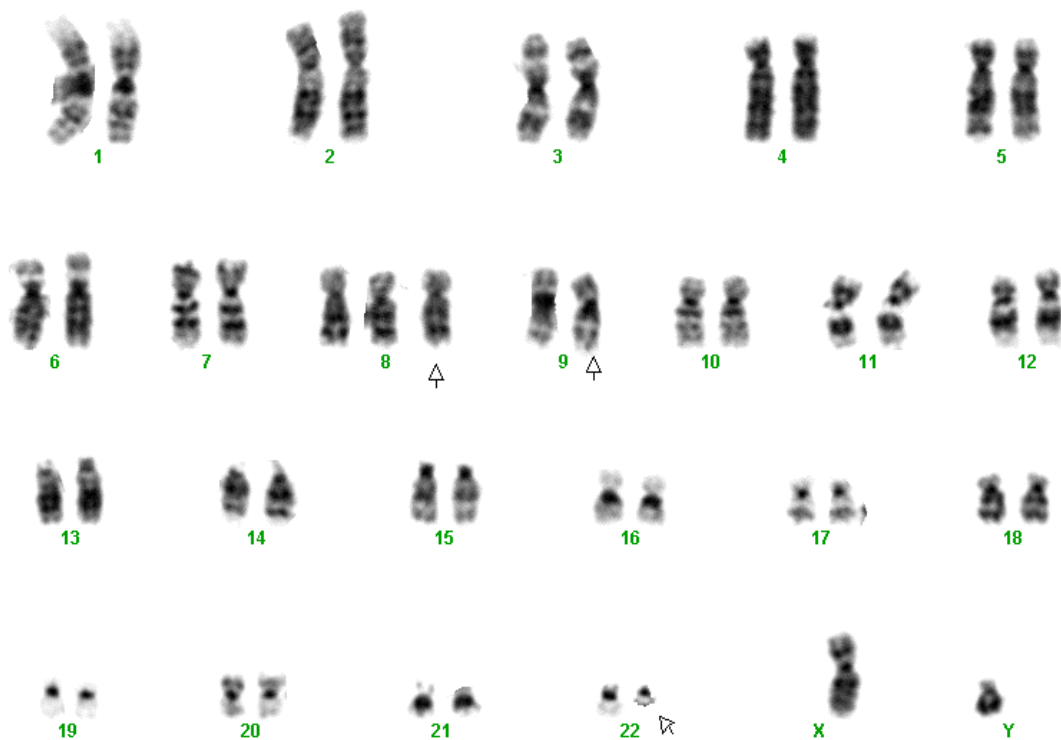


Figura 5: Alterazione addizionale al cromosoma Ph; 46,XY, t(9;22)(q34;q11), +8.

Altre alterazioni meno frequenti sono: la *trisomia dei cromosomi 19* (13%), *17* (5%) e *21* (7%), la *monosomia del cromosoma 7* (5%) e la *perdita del cromosoma Y* (8%) nei pazienti di sesso maschile.

Oltre a queste, possono insorgere altre alterazioni addizionali al cromosoma Ph, sia numeriche che strutturali, ma più rare e possono dare origine ad un quadro cariotipico più complesso.

Quindi, l'evoluzione clonale nella LMC si identifica con la presenza di alterazioni non bilanciate (con perdita o acquisizione di materiale cromosomico), caratteristica della progressione di numerose patologie oncoematologiche. In alcuni casi, più rari, possono comparire alterazioni bilanciate e specifiche di una particolare filiera mieloide. Ad esempio, in alcuni casi di crisi blastica ad impronta promielocitica è stata descritta la traslocazione $t(15;17)(q22;q12)$, caratteristica della leucemia acuta a promielociti; in rari casi di crisi blastica monoblastica è stata osservata una $inv(16)(p13q22)$, associata a leucemia acuta monoblastica. Ad eccezione di questi due ultimi esempi, sono state descritte poche associazioni tra tipo di crisi blastica e tipo di alterazione addizionale.

L'isocromosoma 17q e conseguenti mutazioni a livello del gene che codifica per p53 (localizzato nella banda cromosomica 17p13) sembrano essere più frequenti nelle crisi blastiche mieloidi con basofilia, mentre la monosomia del cromosoma 7 e, in generale, l'ipodiploidia sono più comuni nelle crisi blastiche linfoidi.

Il significato prognostico delle alterazioni genetiche secondarie non è uniforme, sebbene alterazioni che coinvolgono il cromosoma 17 (come l'isocromosoma 17q) siano state ripetutamente dimostrate avere caratteristiche sfavorevoli.

La presenza della duplicazione del cromosoma Ph è stata associata, in analisi multivariata, ad una sopravvivenza più corta (22). Comunque, l'impatto clinico di alterazioni citogenetiche, e di conseguenza anche molecolari, è spesso modificato dalle modalità terapeutiche utilizzate.

1.8.1 Evoluzione clonale

L'evoluzione clonale può essere un marker di progressione clinica nella LMC e in questo caso può riflettere l'instabilità genetica dei progenitori con un'elevata attività proliferativa. Per quanto riguarda i meccanismi cellulari, la presenza delle anomalie citogenetiche addizionali può portare ad un fenotipo più maligno e, possibilmente, meno dipendente dal riarrangiamento BCR-ABL per la proliferazione e la sopravvivenza. Questa minore dipendenza potrebbe avere chiare implicazioni per l'uso dell'Imatinib, agente che ha specificatamente come obiettivo il dominio chinasi della proteina BCR-ABL. La frequenza di EC aumenta con la progressione della malattia, da un 30% in fase accelerata fino all'80% in CB (23). Non tutti gli studi, comunque, hanno mostrato in maniera uniforme un decorso sfavorevole nei pazienti che la presentavano. Per esempio, in assenza di altre caratteristiche di fase accelerata, la presenza di EC non influenza negativamente il decorso dei pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali allogeniche (24).

In uno studio dove si è utilizzato interferone e citarabina a basse dosi si è dimostrata una maggiore sopravvivenza per i pazienti nei quali l'EC era l'unico criterio di accelerazione della malattia (a 3 anni di sopravvivenza, il 67% contro il 22%) (25). Circa il 50% dei pazienti con EC, trattati con α -IFN, mostrava la soppressione del clone Ph+ (26).

In altri studi (27), si concludeva che il significato prognostico della EC nella LMC, era in relazione alla specifica anomalia (in particolare le alterazioni del cromosoma 17 si associano ad una prognosi più sfavorevole), al tempo di progressione e alla presenza di altre caratteristiche di fase accelerata. Queste osservazioni erano descritte in pazienti trattati con α -IFN e quindi sono precedenti all'introduzione dell' Imatinib come nuova terapia per la LMC.

Con l'avvento dell'Imatinib, la rilevanza prognostica dell'EC necessita di nuove indagini. Comunque, recenti studi hanno focalizzato l'attenzione sulla

presenza di alterazioni citogenetiche addizionali al cromosoma Ph nei pazienti trattati con Imatinib (28-30).

1.9 FISH

L'analisi del cariotipo convenzionale su cellule di midollo è considerata la tecnica standard per monitorare la risposta alla terapia. Essa può essere integrata con l'impiego di indagini molecolari quali: reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) e ibridazione in situ fluorescente (FISH) (31).

In particolare la tecnica di FISH è un procedimento che utilizza sonde a DNA specifiche per determinate sequenze geniche coinvolte in un riarrangiamento cromosomico. In questo modo è possibile analizzare anche cellule in interfase, per le quali, la citogenetica convenzionale sarebbe impossibile, dando così un quadro completo della patologia.

La FISH, quindi, permette di:

- caratterizzare in maniera più precisa la traslocazione t(9;22) alla diagnosi di LMC, distinguendo tra riarrangiamento classico, riarrangiamento variante, casi di LMC Ph negative, delezioni di sequenze dei cromosomi derivativi 9 e/o 22 (32);
- valutare in maniera completa (in particolare alla diagnosi) la quota di cellule midollari normali quiescenti rispetto a quelle alterate proliferanti. Ciò potrebbe essere utile ai fini di definire la strategia terapeutica;
- rivelare l'eventuale amplificazione del riarrangiamento BCR-ABL. In alcuni casi, infatti, essa non è associata alla duplicazione del cromosoma Ph, ma è dovuta alla duplicazione e all'inserzione del riarrangiamento in

altre regioni cromosomiche: per questo motivo esso non risulta visibile all'analisi convenzionale del cariotipo;

- determinare in maniera più sensibile la malattia minima residua dopo terapia o trapianto di cellule staminali allogeniche (33).

1.10 La terapia della Leucemia Mieloide Cronica

1.10.1 La terapia convenzionale

Per oltre un secolo lo scopo della terapia della LMC è stato il contenimento della massa leucemica. Questo obiettivo è stato perseguito a partire dagli anni '50 attraverso l'uso di agenti chemioterapici convenzionali a basse dosi, tra i quali busulfano e idrossiurea, o di radiazioni ionizzanti.

L'idrossiurea è stato il farmaco antiproliferativo principale, poiché è un agente antiproliferativo che riduce rapidamente la massa cellulare e induce una buona remissione clinica ed ematologica in circa il 90% dei pazienti. Questo tipo di terapia migliora la qualità della vita del paziente, non induce remissione completa della leucemia ma ne contiene solamente la massa. La leucemia, pertanto, mantiene inalterato il suo percorso dalla fase cronica a quella accelerata e blastica.

1.10.2 Il trapianto di cellule staminali allo geniche

La consapevolezza di questi limiti ha condotto ad alcuni tentativi di intensificazione dei regimi terapeutici, ma essi furono rapidamente messi in secondo piano dal rapido sviluppo del trapianto di cellule staminali allogeniche,

che ha costituito per anni l'indicazione più frequente per la LMC e che costituisce ancora oggi l'unico trattamento in grado di eradicare definitivamente la malattia, soprattutto se effettuato durante la fase cronica (FC); infatti, in fase accelerata, il trapianto è meno efficace ed in fase blastica è praticamente inutile. Il trapianto allogenico, tuttavia, è una procedura gravata da una elevata incidenza di mortalità e morbidità, praticabile soltanto in pazienti di età inferiore ai 55 anni senza altre gravi patologie concomitanti: a causa dell'età avanzata di esordio della LMC e della difficoltà di trovare un donatore di cellule staminali compatibile, il trapianto allogenico costituisce, quindi, una reale opportunità terapeutica, peraltro non esente da rischi, soltanto in una minoranza dei pazienti con LMC (34-36).

1.10.3 L'interferone-alfa ricombinante

L'introduzione dell'interferone-alfa (IFN- α) nella terapia della LMC a partire dai primi anni '80, ha definitivamente ridimensionato il ruolo della terapia convenzionale ed ha iniziato a ridurre le indicazioni al trapianto. L' α -IFN, probabilmente, interferisce in maniera specifica con la traduzione dei segnali proliferativi nelle cellule Ph+, ed è quindi, in grado di indurre una risposta citogenetica completa nel 20-30% dei pazienti trattati, con mantenimento a lungo termine delle risposte ottenute. Una limitazione all'impiego di questo farmaco è data dalla sua non trascurabile tossicità, in particolare nei pazienti anziani. Allo scopo di migliorare i risultati raggiunti, l'interferone è stato associato ad altri agenti citotossici. Soltanto l'associazione dell'interferone con ARA-C ha dimostrato di poter ottenere risultati migliori rispetto all'interferone da solo, senza però un chiaro vantaggio in termini di sopravvivenza (37-43).

1.10.4 L'Imatinib mesilato

La terapia della LMC è stata rivoluzionata a partire dal 1999 dall'arrivo nella pratica clinica dell'Imatinib mesilato (Imatinib o STI571 o Gleevec[®]/Glivec[®]), un agente antineoplastico sviluppato per inibire selettivamente alcune tirosinchinasi implicate nell'oncogenesi. Imatinib è un inibitore della classe delle 2-fenilammino pirimidine (alla quale appartiene la tirosinchinasi ABL) ed è stato creato usando la struttura del sito di legame dell'ATP delle chinasi (Fig.6) (5, 44).

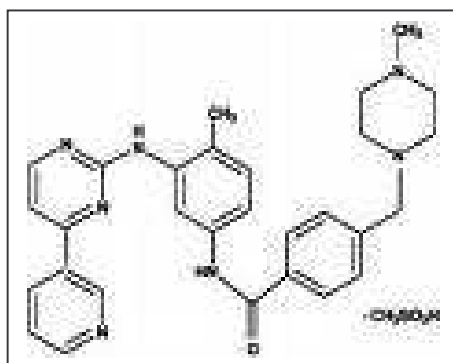


Figura 6: Imatinib

Studi di cristallografia hanno dimostrato che Imatinib si lega alla forma inattiva di almeno 4 tirosinchinasi: ABL (p160), cKit, PDGFR- α e PDGFR- β . Esso è, quindi, in grado di legarsi in maniera specifica alle sequenze ABL della proteina ibrida BCR-ABL (p190, p210, p230, ecc..) nella sua conformazione

inattiva, impedendone l'interazione con ATP ed il passaggio alla forma attiva (Fig.7).

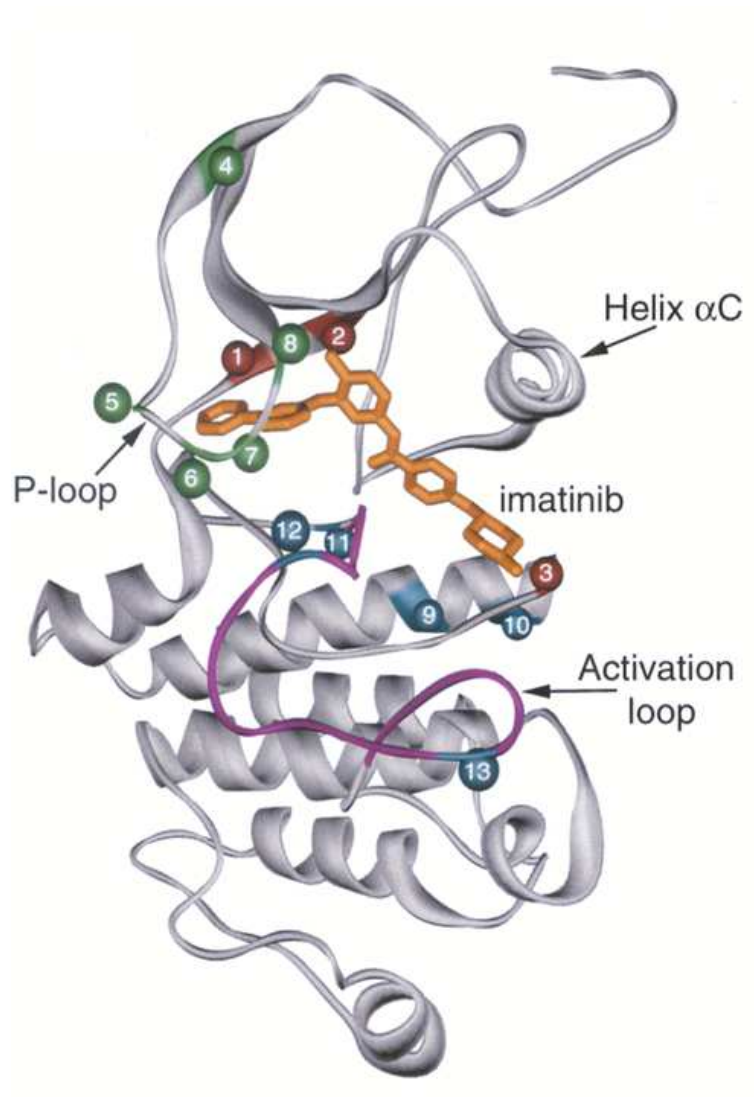


Figura 7: Interazioni dell'Imatinib nella tasca delle tirosinchinasi.

La necessità da parte della chinasi di adottare questa insolita conformazione, che favorisce il legame, potrebbe contribuire all'elevata selettività del composto. Il gruppo N-metilpiperazina interagisce fortemente con ABL anche mediante legami a idrogeno al gruppo carbonile dell'ossatura dell'isoleucina (Ile360) e dell'istidina (His361).

Ne consegue un blocco sia della capacità di BCR-ABL di autofosforilarsi, che della sua capacità di fosforilare proteine bersaglio, attività indispensabili per conferire e mantenere il fenotipo leucemico del clone Ph-positivo (45, 46), inibendo quindi la proliferazione e inducendo l'apoptosi cellulare (5, 44).

Imatinib induce una rapida e completa risposta ematologica in quasi tutti i pazienti con LMC Ph+ che risultano essere in fase cronica (FC), in circa il 50% di quelli in fase accelerata e in minima parte in quelli che risultano essere in crisi blastica (CB) o che hanno una LAL Ph+. La risposta citogenetica maggiore può essere raggiunta in più del 50% dei pazienti che iniziano il trattamento in FC tardiva (47-48) e in più dell'80% dei pazienti trattati alla diagnosi (49). Molte risposte citogenetiche sono complete e sembrano avere una buona efficienza in termini di sopravvivenza.

L'Imatinib ha segnato una rivoluzione nella terapia, costituendo il capostipite dei farmaci cosiddetti "intelligenti" o "mirati", poiché diretti verso uno specifico bersaglio molecolare e, dunque, con un profilo di tollerabilità estremamente favorevole.

La prima evidenza di efficacia è stata fornita dallo studio di fase I, riservato a pazienti resistenti ad IFN- α trattati a dosi variabili da 25 a 1000 mg al giorno, che ha permesso di identificare, quale dose ottimale d'attacco, la posologia di 400 mg/die, destinata a rimanere la dose di riferimento per gli studi successivi. E' risultata evidente una chiara relazione dose-risposta: i pazienti trattati con \geq 300 mg/die hanno ottenuto una remissione ematologica completa (REC) nel

98% dei casi entro 4 settimane dall'inizio della terapia. Inoltre, il 31% di questi pazienti ha ottenuto una risposta citogenetica maggiore (RCgC) (50-51).

Questi risultati hanno condotto all'apertura di 3 studi multicentrici di fase II: uno studio era mirato ad investigare la tollerabilità e l'efficacia di Imatinib 400/die in pazienti in FC resistenti od intolleranti ad IFN- α , mentre altri due erano dedicati a pazienti in fase avanzata di malattia trattati con dosi di Imatinib variabili fra 400 e 600 mg/die (52-55).

Questi studi hanno portato ad alcune importanti conclusioni:

- il profilo di tollerabilità clinica era particolarmente favorevole, con tossicità ematologica più frequente nelle fasi avanzate di malattia, in relazione più alla compromissione della riserva funzionale staminale ematopoietica normale che ad una tossicità diretta del farmaco;
- il trattamento in FC era associato ad un miglior rate di risposta ematologica e citogenetica (65% RCgM vs 24% in FA e 17% in CB);
- il raggiungimento della REC e della RCgM si associava ad un *outcome* significativamente migliore (la risposta citogenetica si è confermata *marker* surrogato di sopravvivenza in tutte le fasi di malattia);
- la dose di 600 mg/die si è mostrata superiore a 400 mg/die nelle fasi avanzate.

Il primo studio che ha permesso di dimostrare in maniera incontrovertibile che l'Imatinib consente di ottenere un livello globale di risposta significativamente superiore rispetto all'IFN è stato uno studio di fase III riservato a pazienti in prima fase cronica (studio IRIS) (56-57): il disegno dello studio prevedeva la randomizzazione (1:1) fra il regime terapeutico standard (IFN associato ad ARA-C a basse dosi) ed Imatinib 400 mg/die (553 pazienti per braccio). Un crossover fra i due trattamenti era previsto in caso di intolleranza o inefficacia. Con un periodo di osservazione medio di 19 mesi, l'Imatinib ha dimostrato una netta superiorità sull'IFN in termini di tollerabilità ed efficacia: in particolare, le

percentuali di RCgM e di Risposta Citogenetica Completa (RCgC) (a 18 mesi) sono risultati dell'87 e 76% rispettivamente per il braccio Imatinib e del 34,7% e 14,5% per il braccio IFN + ARA-C. E' stata inoltre eseguita una valutazione della cinetica e della qualità di risposta molecolare, misurando tramite RQ-PCR (gene di controllo BCR) i livelli di BCR-ABL in 313 pazienti che avevano ottenuto una risposta citogenetica completa: una riduzione dei livelli di trascritto BCR-ABL superiore a 3 logaritmi è stata ottenuta nel 39% dei pazienti trattati con Imatinib e solo nel 2% dei pazienti trattati con IFN + ARA-C (56-57). Nonostante la brevità del periodo di osservazione, anche la sopravvivenza libera da progressione di malattia per il braccio Imatinib (96,7%) è risultata significativamente superiore a quella del braccio IFN (91,5%). Alla dimostrazione di superiore efficacia, lo studio IRIS ha portato come valore aggiunto, la dimostrazione di una qualità di vita dei pazienti trattati con Imatinib significativamente migliore rispetto a quella dei pazienti trattati con IFN + ARA-C. Sulla base di questi risultati, in particolare l'elevata percentuale di risposte citogenetiche (in assoluto e per confronto con l' interferone ricombinante) nel Dicembre 2002 l'Imatinib è stato registrato come terapia di I linea nella LMC.

I risultati dello studio IRIS sono stati recentemente aggiornati con un follow-up mediano di 60 mesi: la percentuale di RCgC dei pazienti trattati con Imatinib è dell'87%, con l'80% di questi pazienti che ha ottenuto una riduzione dei livelli di BCR-ABL ≥ 3 log dopo quattro anni dall'inizio del trattamento. Dopo cinque anni, il 93% di loro è vivo senza progressione in FA/CB e l'83% non ha subito eventi (49).

La inibizione selettiva di BCR-ABL da parte dell'Imatinib ha cambiato in maniera sostanziale la terapia e la storia naturale della malattia. Tuttavia, nonostante l'elevata percentuale di risposte ematologiche e citogenetiche, la resistenza o la refrattarietà al trattamento si può sviluppare in una proporzione

dei casi trattati. Esiste, inoltre, una minoranza dei pazienti che non è in grado di tollerare il trattamento. La resistenza all'Imatinib può essere distinta in resistenza ematologica, citogenetica e molecolare: essa attiene alla incapacità del farmaco di indurre una stabile normalizzazione dell'esame emocromocitometrico, una scomparsa delle metafasi Ph-positive o una significativa riduzione della quantità di trascritto ibrido BCR-ABL.

Per pazienti in queste condizioni le opzioni possibili sono:

- il trapianto allogenico, se è disponibile un donatore e se il trapianto non è controindicato;
- l'imatinib ad alte dosi (600-800 mg/die);
- gli inibitori delle tirosin-chinasi di seconda generazione (Nilotinib e Dasatinib);
- la terapia sperimentale.

1.11 Tecniche di monitoraggio e definizione dei criteri di risposta

L'analisi di citogenetica convenzionale (CC) eseguita su aspirato di midollo osseo rappresenta l'approccio standard per monitorare la risposta al trattamento con Imatinib ed è anche l'unico metodo per determinare aberrazioni cromosomiche addizionali al cromosoma Philadelphia che possano avere un ruolo prognostico.

Tuttavia la CC non è sempre efficace nei pazienti trattati con Imatinib a causa di un numero insufficiente di metafasi valutabili ottenute per l'analisi. Per questo l'analisi di ibridazione fluorescente in situ (FISH) può essere utilizzata come metodica addizionale o alternativa per valutare la risposta alla terapia (58-59).

La risposta citogenetica, basata sui risultati della citogenetica convenzionale, è così definita (63):

- completa (RCgC): 0% metafasi Ph-positive;
- parziale (RCgP): 1-35% metafasi Ph-positive;
- maggiore (RCgM): 0-35% metafasi Ph-positive;
- minore (RCgminor): 36-65% metafasi Ph-positive;
- minima (RCgminimal): 66-95% metafasi Ph-positive;
- nessuna risposta (NR): > 95% metafasi Ph-positive.

La risposta molecolare (determinata tramite *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, RQ-PCR) è definita come rapporto BCR-ABL/ABL. E' stata definita risposta molecolare maggiore un rapporto BCR-ABL/ABL inferiore a 0.05%, corrispondente ad una riduzione di 3 logaritmi da un valore mediano baseline nel nostro laboratorio. Recentemente la MMR è stata definita come un rapporto BCR-ABL/gene di controllo inferiore a 0.05% in una scala numerica internazionalmente concordata (International Scale). Il nostro laboratorio ha partecipato al processo di standardizzazione, ma il fattore di conversione per esprimere i nostri risultati secondo la IS è attualmente in corso di validazione. E' stato definito trascritto non-detectabile un rapporto BCR-ABL/ABL inferiore a 0.001%, corrispondente al limite inferiore di sensibilità della metodica (10^{-4}). I campioni negativi in RQ-PCR sono stati analizzati tramite nested-PCR ed è stata definita risposta molecolare completa (RCgM) la negatività di quest'ultima (59-62).

La progressione di malattia è stata definita dalla presenza di almeno uno dei seguenti criteri (63).

- > 15% di blasti nel midollo o nel sangue periferico;
- persistente trombocitopenia ($PLT < 100.000/mm^3$), non legata alla terapia in corso;
- $\geq 20\%$ basofili nel midollo o nel sangue periferico;

- presenza di grandi foci o *clusters* di cellule blastiche nella biopsia ossea;
- interessamento extramidollare (escluso l'interessamento splenico).

Il fallimento della terapia è stato definito in accordo con le Linee Guida ELN (European Leukemia Net) dalla presenza di uno dei seguenti criteri (63):

- assenza di risposta ematologica a 3 mesi;
- < CHR o assenza di risposta citogenetica a 6 mesi;
- < RCgP a 12 mesi o < RCgC a 18 mesi;
- perdita della CHR o della RCgC;
- progressione o comparsa di mutazioni puntiformi in grado di conferire resistenza ad imatinib.

2. OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio è stato valutare la correlazione tra citogenetica convenzionale (CC) e citogenetica molecolare (FISH) in termini di risposta alla terapia, in pazienti con leucemia mieloide cronica (LMC) in fase cronica (CP) trattati con Imatinib. Questo studio prospettico è stato svolto all'interno di tre studi nazionali multicentrici del GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) CML Working Party (WP).

La citogenetica molecolare è stata in seguito correlata alla risposta di biologia molecolare.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Protocollo LMC 021-022-023

Al fine di valutare la correlazione tra la risposta in CC, in FISH e in RQ-PCR in pazienti con LMC in fase cronica (CP) trattati con Imatinib è stato svolto uno studio multicentrico prospettico all'interno di protocolli terapeutici nazionali proposti dal GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) CML Working Party (WP):

- CML/021, studio di fase II, Imatinib 800 mg/die in pazienti a rischio Sokal intermedio;
- CML/022, studio di fase III, Imatinib 400 vs 800 mg/die in pazienti a rischio Sokal elevato;
- CML/023, studio osservazionale, Imatinib 400 mg/die.

Il trattamento e gli studi dei protocolli risultano in accordo con le buone pratiche di laboratorio della dichiarazione di Helsinki. Novartis Pharma ha fornito il farmaco e supportato la raccolta dei campioni e il monitoraggio dei pazienti.

Lo studio prospettico multicentrico originava anche dalla necessità dei singoli laboratori di citogenetica, coinvolti nello studio, di poter comprendere se esisteva una reale possibilità di scelta tra CC e FISH, nella valutazione della risposta alla terapia.

Complessivamente le indagini di citogenetica convenzionale e molecolare sono state compiute su cellule del midollo osseo in 36 laboratori, di cui 14 di riferimento per i centri che non avevano la possibilità di effettuare tali analisi. I tempi degli studi seguivano il seguente schema:

	DIAGNOSI	3° mese	6° mese	12° mese
021	CC+FISH		CC+FISH	CC+FISH
022	CC+FISH	CC+FISH	CC+FISH	CC+FISH
023	CC+FISH		CC+FISH	CC+FISH

La raccolta dei dati è stata centralizzata nell'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seragnoli" di Bologna.

La raccolta dei prelievi di sangue periferico (PBL) per la RQ-PCR è stata centralizzata nel centro di Bologna, e analizzati anche nei laboratori di biologia molecolare di Napoli e Torino.

3.2 Analisi citogenetica convenzionale

L'analisi citogenetica convenzionale è eseguita su cellule da midollo osseo. Vengono allestite colture cellulari con 20 milioni di cellule in 10 ml di terreno, immediatamente all'arrivo del campione e in sterilità. Il terreno contiene RPMI 1640 arricchito al 30% con siero fetale bovino scomplementato, glutammina (200mM) e penicillina-streptomicina (50 I.U-50 µg/ml).

All'inizio dello studio sono allestite 2 colture diverse per paziente, le quali vengono incubate a 37°C al 5% di CO₂: una per 24 e una per 48 ore. Dopo

L'incubazione si aggiungono 80 µl di colchicina e si incubano nuovamente le colture a 37°C al 5% di CO₂ per 40 minuti.

L'aggiunta di 80 µl di colchicina, durante gli ultimi minuti di coltura, determina il blocco delle cellule in profase e/o prometafase e/o metafase.

In seguito, le colture sono centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti in modo da ottenere un "bottone cellulare" e un sovrnatante che viene rimosso. Si sottopone, poi, il bottone cellulare ad un trattamento ipotonico aggiungendo 8 ml di soluzione KCl 0,075 M che deve essere miscelata al bottone cellulare. Dopo 10 minuti di incubazione a 37°C, il materiale viene centrifugato per 10 minuti a 1200 rpm e il sovrnatante ottenuto viene nuovamente eliminato. Al bottone cellulare si aggiungono, poi, 5 ml di fissativo costituito da acido acetico e alcool metilico nella proporzione 1:3, agitando contemporaneamente sul vortex.

Il materiale viene centrifugato per altri 10 minuti a 1200 rpm, il sovrnatante è eliminato e il bottone sottoposto a 3 lavaggi con fissativo fresco in modo da eliminare il materiale cellulare superfluo, che potrebbe ostacolare l'analisi delle piastre metafasiche.

Dopo il terzo lavaggio, il bottone cellulare viene sospeso in fissativo e vengono allestiti due vetrini, per ogni campione, con qualche goccia di materiale. I vetrini sono "invecchiati" in termostato a 60°C da 1 a 3 giorni e poi colorati mediante bandeggio G cromosomico.

3.3 Tecnica di bandeggio cromosomico

Il bandeggio cromosomico prevede l'utilizzo di diverse metodiche in grado di evidenziare una struttura cromosomica normalmente non visibile.

Non si tratta di un semplice artefatto, ma di un sistema per avvicinarsi ad una più approfondita conoscenza dell'organizzazione della catena di DNA quando si dispone a formare la struttura definitiva del cromosoma.

I bandeggi G e Q (Giemsa e Quinacrina) sono i più usati ed evidenziano lo stesso pattern di bande. Quando si vuole avere una migliore identificazione dei tratti telomerici dei cromosomi, si ricorre al bandeggio R/T (Reverse), che fornisce un pattern opposto ai precedenti. Nel nostro laboratorio è utilizzato il bandeggio GTG.

3.3.1 Bandeggio GTG

I vetrini, allestiti con le specifiche metodiche, sono immersi in una soluzione 0,2N di HCl per 5 minuti a temperatura ambiente. Successivamente, dopo essere stati sciacquati in acqua corrente, vengono immersi per 20 minuti in una vaschetta contenente una soluzione di 1xSSC (soluzione di NaCl e Na-citrato) a bagnomaria a 60°C.

In seguito, ogni vetrino viene colorato con 4 ml di colorante (3ml di tampone a pH 6,8 e 1ml di Wright' stain 0,06%) per circa 3 minuti.

I vetrini sono poi esaminati al microscopio ottico e per ogni paziente vengono osservate almeno 20 metafasi alla diagnosi e 30 metafasi in corso di terapia (*Genikon 3.7.27, Nikon*).

L'esame di ogni metafase è effettuato attraverso un sistema di analisi computerizzato collegato al microscopio e la classificazione dei cromosomi viene eseguita secondo l'International System Chromosome Nomenclature (ISCN).

Le alterazioni cromosomiche sono valutate come clonali quando due o più cellule presentano la stessa anomalia strutturale o lo stesso cromosoma

soprannumerario e tre o più cellule presentano la stessa monosomia. Le alterazioni presenti in numero inferiore di cellule sono definite non clonali.

3.4 Metodica FISH

Gli studi di FISH in doppia colorazione sono stati eseguiti con le seguenti sonde a DNA per la caratterizzazione della t(9;22).

3.4.1 Sonde utilizzate

LSI BCR-ABL Dual-Colour Dual-Fusion Vysis (Vysis Inc., Richmond, United Kingdom)

E' una miscela di due sonde: la sonda *LSI BCR* marcata con *Spectrum Green* (marcata con fluoresceina di colore verde) e la sonda *LSI ABL* marcata con *Spectrum Orange* (marcata con rodamina di colore rosso).

La sonda *LSI ABL* ha come target genomico una regione di 650 kb circa che si estende dall'area centromerica del gene argininosuccinato sintetasi (ASS) ad una zona telomerica rispetto all'ultimo esone ABL. La sonda *LSI BCR* copre una distanza genomica di circa 1,5 Mb, che comincia entro il locus delle sequenze variabili delle catene leggere lambda delle immunoglobuline (IGLV), si estende lungo il cromosoma 22 attraverso il gene BCR fino a terminare approssimativamente a 900 Kb da BCR in senso telomerico (Fig.8).

Una cellula normale mostrerà 2 segnali rossi, per i cromosomi 9 normali e 2 segnali verdi per i cromosomi 22 normali, mentre una cellula con t(9;22)(q34;q11) mostrerà un segnale rosso e un segnale verde rispettivamente per i cromosomi 9 e 22 normali e due segnali di fusione rosso/verde (giallo) per

i 2 cromosomi derivativi coinvolti nella traslocazione: uno per il 9 e l'altro per il 22 (quest'ultimo rappresenta il cromosoma Philadelphia) (Fig.9).

BCR-ABL Dual-Colour Dual-Fusion Q-BIOgene (Q-BIOgene-Resnova, Roma, Italia)

E' una miscela di due sonde: la sonda *LSI BCR* marcata con *Spectrum Green* (verde) e la sonda *LSI ABL* marcata con *Spectrum Orange* (rosso). La sonda *ABL* ha come target genomico due regione di 500 kb circa che ricoprono rispettivamente la regione del gene argininosuccinato sintetasi (ASS) ad una zona telomerica a monte dell'esone 11 in 3' del gene *ABL*. La sonda *LSI BCR* ha come target genomico due regione di 500 kb, che si estendono al 5' e al 3' del gene *BCR* (Fig.8).

Una cellula normale mostrerà 2 segnali rossi, per i cromosomi 9 normali e 2 segnali verdi per i cromosomi 22 normali, mentre una cellula con t(9;22)(q34;q11) mostrerà un segnale rosso e un segnale verde rispettivamente per i cromosomi 9 e 22 normali e due segnali di fusione rosso/verde (giallo) per i 2 cromosomi derivativi coinvolti nella traslocazione: uno per il 9 e l'altro per il 22 (quest'ultimo rappresenta il cromosoma Philadelphia) (Fig.9).

LSI BCR-ABL Extra-Signal Vysis (Vysis, Richmond, United Kingdom)

E' una miscela di due sonde: la sonda *LSI BCR* marcata con *Spectrum Green* (verde) e la sonda *LSI ABL* marcata con *Spectrum Orange* (rosso). La sonda *LSI ABL* ha come target genomico una regione di 650 kb circa che si estende dall'area centromerica del gene argininosuccinato sintetasi (ASS) ad una zona

telomerica rispetto all'ultimo esone ABL. La sonda LSI BCR copre una distanza genomica di circa 300 kb, si estende lungo il cromosoma 22 all'interno del gene BCR (Fig.8).

Una cellula normale mostrerà 2 segnali rossi, per i cromosomi 9 normali e 2 segnali verdi per i cromosomi 22 normali, mentre una cellula con t(9;22)(q34;q11) mostrerà due segnali rossi per il cromosoma 9, un segnale verde per il cromosoma 22 normale e un segnale di fusione rosso/verde (giallo) per il cromosoma 22 derivativo coinvolto nella traslocazione (cromosoma Philadelphia).

Questa sonda viene utilizzata per accertare la presenza di delezione del derivativo del cromosoma 9. Infatti, in alcuni casi, possono avvenire delezioni nel punto di rottura 3' del gene BCR e/o nel punto di rottura 5' del gene ABL. Risulterà così la presenza di 1 segnale rosso (cromosoma 9 normale), 1 segnale verde (cromosoma 22 normale) e di un unico segnale di fusione (Fig.10).

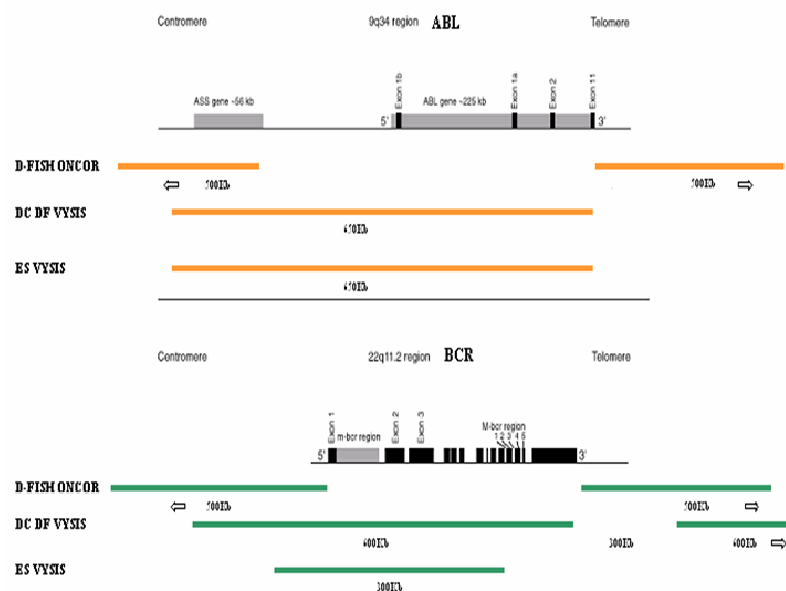


Figura 8: Sonde FISH utilizzate nello studio.

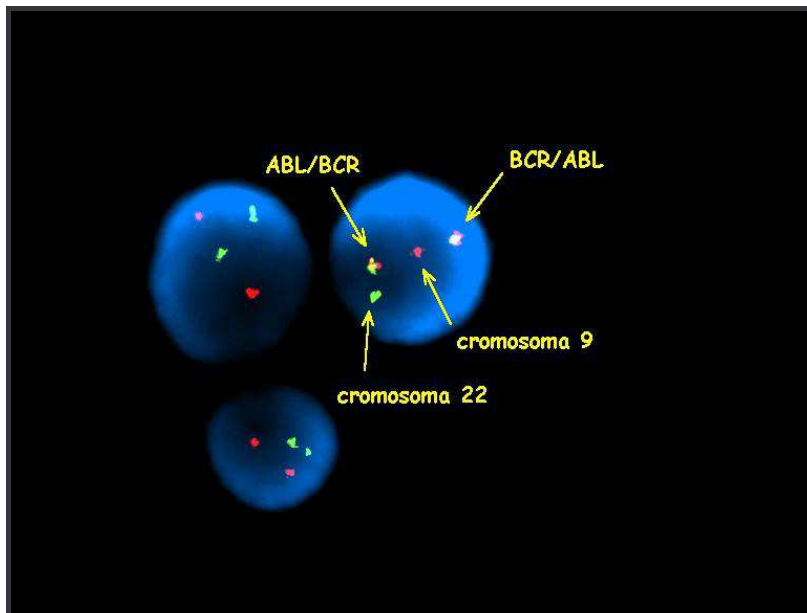


Figura 9: FISH con sonda Vysis/Oncor DC-DF.

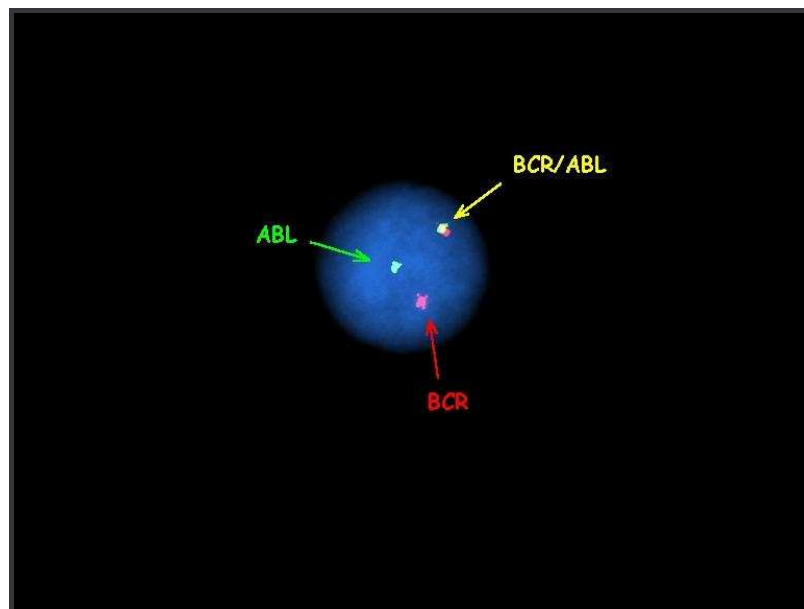


Figura 10: FISH con sonda Vysis ES.

I vetrini sono allestiti con il materiale ottenuto dalla preparazione citogenetica, conservato a -20°C. In seguito, vengono pretrattati per 30 minuti a 37°C in 2XSSC (17,5g di cloruro di sodio e 8,2g di citrato tri-sodico in 1 litro di acqua distillata) e 0,3% Igepal (NP-40) a pH 7.

I vetrini sono poi deidratati in lavaggi successivi di 2 minuti ciascuno in etanolo a percentuali crescenti: 70%, 80% e 100%.

La miscela di ibridizzazione viene preparata con 7 µl di tampone, 2 µl di acqua distillata e 1 µl di sonda per ogni vetrino. Una volta posti 10 µl di tale miscela su ogni vetrino, si dispongono i vetrini nella macchina Hybrite (*Vysis Inc., Richmond, United Kingdom*) (che funge da camera umida e buia) dove avviene una codenaturazione di sonda e vetrino a 70°C per 1 minuto. Subito dopo avviene l'ibridizzazione tra DNA della sonda e DNA del materiale per 24 ore a 37°C.

Al termine delle 24 ore, i vetri sono lavati per 3 minuti in una soluzione di 2XSSC e 0,3% NP-40 a 70°C, quindi in una soluzione 2XSSC e 0,3% NP-40 a 60°C per 3 minuti e infine in una soluzione di PBD 1X a temperatura ambiente per 5 minuti.

I vetrini, lasciati asciugare all'aria, vengono controcolorati con 4,6 diamino-2-phenylindole (DAPI III) e in seguito osservati al microscopio a fluorescenza equipaggiato con filtro a singola banda FITC/TRITC/DAPI.

Vengono analizzate, dove possibile, almeno 200 cellule alla diagnosi e 300 cellule in corso di terapia per vetrino da due operatori indipendentemente (*Eclipse E1000, Nikon*).

Un caso si considera BCR-ABL negativo, quando la percentuale dei nuclei positivi per lo specifico riarrangiamento è inferiore all'1% (cut-off).

3.5 Metodica di RQ-PCR

La real-time PCR è una tecnica che permette contemporaneamente l'amplificazione e il rilevamento dell'amplificato: si può monitorare la quantità di cDNA durante la fase esponenziale di crescita (quando l'efficienza dipende dalla concentrazione iniziale del template) per risalire alla quantità di template di partenza. Questa tecnica è stata utilizzata per quantificare i livelli del trascritto BCR-ABL (p210 o p190).

Questo è possibile grazie all'introduzione all'interno della reazione di una sonda complementare ad un tratto della sequenza di interesse, legata covalentemente a 2 molecole fluorescenti, un Quencer (Q) al 3' (TAMRA, fluorocromo a bassa energia) e un Reporter (R) al 5' (FAM, fluorocromo ad alta energia): R, eccitato ad una determinata lunghezza d'onda, emette fluorescenza, mentre Q la sopprime, poiché assorbe i fotoni emessi da R. Le condizioni perché ciò avvenga sono la vicinanza tra R e Q e la presenza di sovrapposizione tra lo spettro di emissione di R e quello di assorbimento di Q. Durante la reazione di amplificazione l'attività 5'-3' esonucleasica della Taq polimerasi determina la degradazione della sonda, con allontanamento di R da Q e generazione del segnale di fluorescenza (Fig.11).

La variazione della fluorescenza necessaria per determinare il numero di molecole contenute nel campione analizzato viene calcolato come $\Delta R_n = R(+)-R(-)$: R(+) è la fluorescenza del campione analizzato, normalizzata rispetto alla fluorescenza di ROX (un fluorocromo il cui rapporto con la luminosità del campione serve per ridurre l'errore); R(-) è la fluorescenza del Not Template Control (NTC), normalizzata rispetto a ROX. Lo strumento rileva l'intensità di fluorescenza ad ogni ciclo di reazione, permettendo di monitorare la crescita esponenziale del template. Per ogni campione si otterrà un grafico con la sua curva di crescita, che partirà tanto prima quanto maggiore era la quantità di template di partenza (Fig.12).

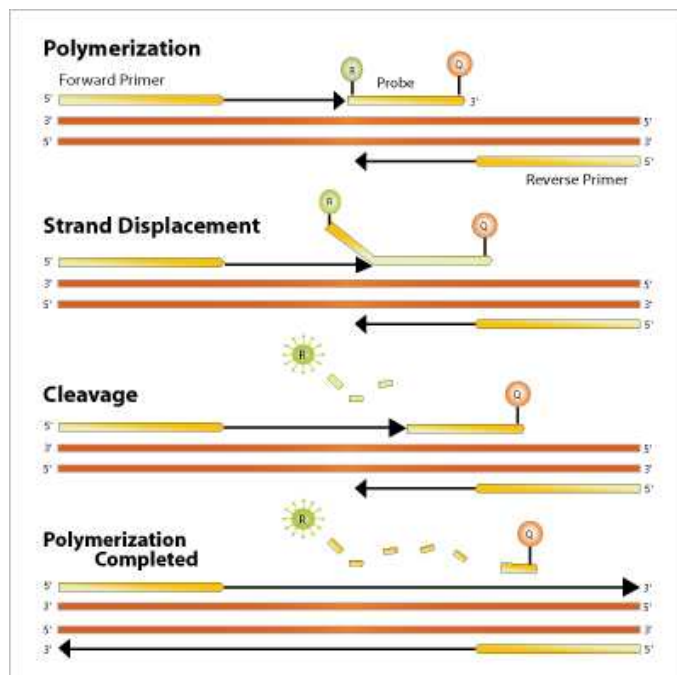


Figura 11: RQ-PCR.

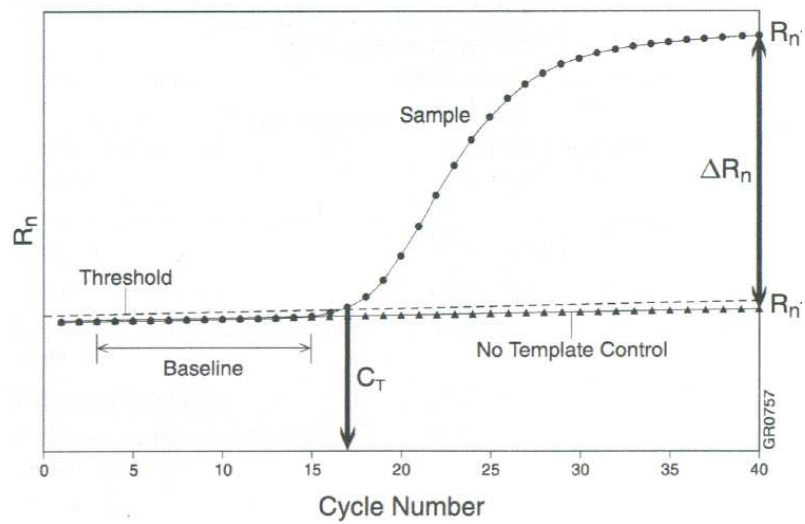


Figura 12: Curva di crescita.

Nella curva di amplificazione si evidenziano la Threshold, cioè la linea soglia scelta in fase di reazione esponenziale (nel nostro caso fissata a 0,1), che interseca le curve di tutti i campioni, e il ciclo soglia (Ct, Threshold Cycle), cioè il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold, poiché avviene il primo significativo aumento della fluorescenza. Durante l'analisi il valore del Ct è utilizzato, perché proporzionale al numero di copie iniziali del template. Per ricavare il numero iniziale di template è necessario costruire una curva standard, usando plasmidi a concentrazione nota, contenenti la sequenza studiata: la curva viene costruita utilizzando la relazione lineare tra il Ct e il logaritmo della concentrazione iniziale del template nei campioni analizzati.

La quantificazione Real Time è stata condotta mediante *ABI PRISM 7700 Sequence Detector System (Applied Biosystem)*. Ciascun esperimento è stato condotto in duplicato, in un volume finale di 25 µl, utilizzando 12,5 µl di Universal Master Mix 2X (*Applied Biosystem*), primers, sonda TaqMan e 5 µl del cDNA in esame. Contemporaneamente ai campioni sperimentali, è stata eseguita la quantificazione di cinque diluizioni note (10^6 - 10^5 - 10^3 - 10^2 -10) di un plasmide del gene in esame (IPSOGEN), per poter costruire la curva standard, da cui sono state poi ricavate le informazioni sulla quantità assoluta delle molecole di cDNA del gene target. Le condizioni della reazione di amplificazione sono le seguenti: 50°C per 2 min, 95°C per 10 min, 95°C per 15s, 60°C per 1 min, il tutto ripetuto per 50 cicli. L'acquisizione dei dati avviene esclusivamente in fase di elongazione (a 60°C). Per normalizzare l'espressione del trascritto BCR-ABL si è rapportato il suo valore a quello di un gene housekeeping, nel nostro studio ABL. La quantità di trascritto è stata espressa tramite *ratio BCR-ABL/ABL x 100* (58-59).

3.6 Statistica

La correlazione tra la percentuale di metafasi Ph positive osservate in CC, la percentuale delle cellule con riarrangiamento BCR-ABL in FISH e la presenza di livelli di trascritto BCR-ABL è stata svolta utilizzando il programma *Graph Pad Prism 4* (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

La correlazione è stata valutata utilizzando il test di Pearson.

4. RISULTATI

Dal 2003 al 2007, 567 pazienti con diagnosi di Leucemia Mieloide Cronica (LMC) sono stati arruolati in tre protocolli terapeutici (021, 022, 023) proposti dal Gruppo GIMEMA WP. Tutte le indagini citogenetiche sono state svolte dai laboratori del Gruppo GIMEMA WP, mentre la centralizzazione dei risultati è avvenuta presso l'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seragnoli" di Bologna. Cinquecentoquindici (90.8%) risultavano essere valutabili sia in citogenetica convenzionale che in citogenetica molecolare.

Alla diagnosi tutti i pazienti presentavano la traslocazione classica $t(9;22)(q34;q11)$, o una sua variante, osservata in 30 pazienti (5.8%). Inoltre 23 casi (4.5%) mostravano alterazioni addizionali e 59 (11.5%) presentavano la delezione del derivativo del cromosoma 9, evidenziata dall'analisi in FISH. Tra le alterazioni addizionali quelle maggiormente presenti erano la perdita del cromosoma Y (39.1%), la trisomia del cromosoma 8 (13%) e la trisomia del cromosoma 19 (8.7%).

In corso di terapia sono stati effettuati 1090 studi citogenetici: 665 (61.1%) risultavano essere valutabili contemporaneamente in CC e in FISH. Il restante 38.9% risultava non essere valutabile per i seguenti motivi: 303 (27.8%) casi non erano valutabili contemporaneamente in CC e in FISH; 80 (7.3%) erano stati valutati con un numero di metafasi inferiore a 10; 38 (3.5%) presentavano la delezione del derivativo del cromosoma 9 (quindi da escludere a causa della imprecisione nel monitorare la delezione in FISH dovuta ad un cut-off superiore di falsi positivi); infine 4 (0.4%) non mostravano la traslocazione alla diagnosi citogenetica, ed erano classificati pertanto come LMC Ph negative. Per ogni studio erano analizzate dalle 10 alle 100 metafasi (mediana = 20 metafasi; media = 24 metafasi).

Dei 665 studi citogenetici valutabili la Risposta Citogenetica Completa (RCgC) era raggiunta in 537 (80.7%) analisi, la Risposta Citogenetica Parziale (RCgP) in 77 (11.6%) analisi, la Risposta Citogenetica Minore (RCgminore) in 18 (2.7%), la Risposta Citogenetica Minima (RCgminimal) in 14 (2.1%) ed, infine, 19 (2.9%) non presentava alcuna risposta alla terapia (NR).

Valutando la distribuzione delle risposte citogenetiche nei diversi intervalli di FISH positività, si notava come la maggior parte dei casi in RCgC (444 casi; 82.7%) presentava valori di FISH < 1%, quindi considerata negativa; il 13.2% presentava 1-5% cellule positive; il 3.7% il 5-20% ed infine solo due pazienti (0.4%) mostravano un'elevata percentuale di cellule con riarrangiamento BCR-ABL (Tab.1).

Risposta	N° studi CC	FISH				
		<1 %	1-5 %	5.1-20 %	20.1-50 %	> 50 %
RCgC	537	444 (82.7%)	71 (13.2%)	20 (3.7%)	2 (0.4%)	
RCgP	77	7 (9.1%)	32 (41.6%)	30 (39%)	6 (7.7%)	2 (2.6%)
RCgmonor	18		1 (5.6%)	3 (16.7%)	8 (44.4%)	6 (33.3)
RCgminimal	14			1 (7.1%)	3 (21.5%)	10 (71.4%)
NR	19			2 (10.5%)	2 (10.5%)	15 (79%)

Tabella 1: Distribuzione della Risposta Citogenetica rispetto ai risultati di FISH.

Le RCgP erano maggiormente distribuite tra l'1 e il 50% di positività in FISH (88.3%), mentre tutte le altre risposte erano distribuite entro alti valori di positività, compatibilmente con il significato stesso della risposta citogenetica (Tab.1).

Per ogni studio mediante le analisi in FISH, erano analizzate da 66 a 2677 cellule (mediana = 300 cellule; media = 298 cellule). Si è quindi cercato di valutare un'eventuale corrispondenza tra il numero di metafasi analizzate e la corrispondente distribuzione in FISH. I risultati sono stati valutati comparando le analisi effettuate su 20 o più metafasi e quelle in cui era stato valutato un numero inferiore di metafasi (Tab.2).

Risposta	N° studi CC	FISH				
		< 1 %	1-5 %	5.1-20 %	20.1-50 %	> 50 %
RCgC ≥20met	406	342 (84.2%)	49 (12.1%)	14 (3.5%)	1 (0.2%)	
RCgC <20met	131	102 (77.9%)	22 (16.8%)	6 (4.6%)	1 (0.7%)	
RCgP ≥20met	70	7 (10%)	27 (38.6%)	28 (40%)	6 (8.6%)	2 (2.8)
RCgP <20met	7		5 (71.4%)	2 (28.6%)		

Tabella 2: Distribuzione delle RCgC e delle RCgP in relazione ai risultati di FISH, considerando il numero di metafasi osservate (superiore o inferiore a 20).

Quattrocentosei studi in CC valutati con almeno 20 metafasi, risultavano essere in RCgC; di questi, in FISH 342 (84.2%) non presentavano riarrangiamento BCR-ABL, 49 (12.1%) avevano una bassa percentuale di cellule positive (1-5%), 14 (3.5%) ricadevano nell'intervallo compreso tra 5.1 e 20% e solo un caso mostrava un valore superiore al 20%: 27.3% di cellule positive al 3° mese di trattamento).

Dei 131 studi in RCgC valutati con un numero di metafasi inferiore a 20, in FISH 101 (77.9%) erano negativi, 22 (16.8%) mostravano una bassa positività (1-5%), 6 (4.6%) ricadevano nell'intervallo compreso tra 5.1 e 20% e un caso mostrava il 31% di cellule positive.

Settantasette studi mostravano una RCgP. In 70 di questi erano state osservate almeno 20 metafasi: in FISH 7 (10%) erano negative, 55 (78.6%) risultavano essere positive distribuendosi nell'intervallo 1-20% di positività, 6 (8.6%) ricadevano nell'intervallo compreso tra 20 e 50%. Solo due studi mostravano valori di positività superiori al 50%: 52.8% e 64% di cellule positive in FISH vs 20% e 13.3% di metafasi Ph positive, rispettivamente al 6° e al 12° mese di terapia.

Solo 7 studi in RCgP sono stati valutati con un numero inferiore di metafasi, che variava da 10 a 15 per studio; la loro distribuzione in FISH ricadeva nell'intervallo 1-11% di positività.

Comparando le percentuali degli studi in RCgC con FISH < 1%, non vi erano differenze significative tra quelli compiuti su almeno 20 metafasi e quelli compiuti su un numero inferiore di metafasi. CC e FISH risultavano paragonabili per quanto riguardava la valutazione della RCgC: 444 studi (82.7%) mostravano una percentuale di cellule BCR-ABL positive < 1%.

A bassi livelli di positività citogenetica, la FISH risultava essere più sensibile della CC; infatti, dei 537 studi in RCgC, 93 (17.3%) presentavano cellule con riarrangiamento BCR-ABL positivo alla FISH. In particolare dei 406 casi in RCgC valutati con almeno 20 metafasi, 63 (15.5%) studi erano distribuiti tra l'1

e il 20% di positività in FISH e solo un caso presentava il 27.3% di cellule positive. Dei 131 studi in RCgC valutati con un numero di metafasi inferiore a 20, 28 (21.4%) erano distribuiti tra l'1 e il 20% di positività in FISH e un caso era superiore al 20%.

Tenendo conto dei risultati ottenuti con le indagini di FISH, in totale 451 casi risultavano negativi, in quanto presentavano una percentuale di cellule con riarrangiamento BCR-ABL inferiore all'1%. Comunque, in 7 (1.6%) di questi, erano osservate metafasi Ph positive in CC valutata su 20-30 metafasi. La percentuale di metafasi Ph positive variava dal 3.3% al 10% (mediana 5%). In 2 casi vi era assenza completa di riarrangiamento in FISH. L'analisi molecolare non era valutabile in un caso, 4 casi non risultavano in RMolM, che veniva, invece, osservata negli ultimi due casi.

Era stata così osservata una buona correlazione tra le analisi in CC e in FISH in termini di risposta alla terapia. Lo studio di correlazione compiuto con il test di Pearson ($r^2=0.89$, $p<0.0001$; $y=0.716x+0.8775$), mostrava come la percentuale di nuclei BCR-ABL positivi era proporzionale alla percentuale di metafasi Ph positive a qualsiasi grado di cellule alterate osservabili (Fig.13).

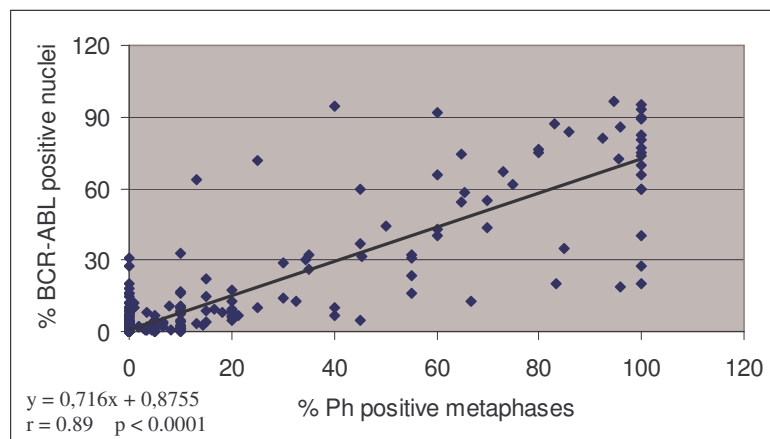


Figura 13: Correlazione tra la percentuale di cellule BCR-ABL determinato dall'indagine in FISH e la percentuale di metafasi Ph positive osservate in CC.

Considerando l'indagine in FISH più sensibile rispetto alla CC si è voluto confrontare e correlare i risultati ottenuti con le analisi di biologia molecolare condotte con RQ-PCR, soprattutto per quanto riguardava il raggiungimento della RCgC.

Tutti i campioni, quindi, erano valutati non solo da un punto di vista citogenetico, su cellule midollari, ma anche con indagini di biologia molecolare su cellule da sangue periferico. I prelievi per le indagini di biologia molecolare erano raccolti nel centro di Bologna e studiati nei tre centri che hanno effettuato le analisi: Bologna, Torino e Napoli. I risultati venivano poi centralizzati a Bologna.

Alla diagnosi tutti i pazienti risultavano quindi essere positivi in CC, in FISH e in RT-PCR (presenza dell'mRNA di BCR-ABL) per la presenza della t(9;22)(q34;q11).

Volendo focalizzare l'attenzione sulla correlazione delle tre diverse metodiche in corso di terapia, dei 665 studi valutabili contemporaneamente in CC e in FISH, 631 (94.8%) risultavano essere valutabili anche in RQ-PCR su cellule di sangue periferico. Di questi, 512 erano in RCgC: 224 (43.8%) erano in RCgC e RMolM, 263 (51.4%) erano in RCgC ma non in RMolM, 25 (4.8%) erano in RCgC mentre il trascritto di BCR-ABL non risultava amplificato per cicli molto elevati di RQ-PCR (ND) (Tab.3).

	N° studi	FISH			
		<1 %	1-5 %	5.1-20 %	> 20%
RCgC and RMolM	224	196 (87.5%)	20 (8.9%)	8 (3.6%)	
RCgC and RQ-PCR > RMolM	263	209 (79.5%)	42 (16%)	10 (3.8%)	2 (0.7%)
RCgC and RQ-PCR = ND	25	20 (80%)	5 (20%)		

Tabella 3: Distribuzione dei casi di RCgC e della Risposta Molecolare rispetto alla FISH.

Dei 224 studi in RCgC e RMolM, in FISH 196 (87.5%) non presentavano riarrangiamento BCR-ABL e 28 (12.5%) erano, invece, positivi: 20 (8.9%) risultavano essere compresi nell'intervallo 1-5% di positività e 8 (3.6%) nell'intervallo 5.1-20%. Dei 263 studi in RCgC ma con una percentuale di trascritto BCR-ABL più elevata in FISH, 209 (79.5%) non presentavano riarrangiamento BCR-ABL, 54 (20.5%) erano positivi: 42 (16%) erano compresi nell'intervallo 1-5% di positività, 10 (3.8%) risultavano essere compresi nell'intervallo 5.1-20% di positività e solo due (0.7%) mostravano valori di positività superiori al 20%. Infine dei 25 studi in RCgC e Risposta Molecolare ND, in FISH 20 (80%) risultavano essere negativi e 5 (20%) mostravano valori tra l'1-5%; erano tutti casi in cui erano state osservate almeno 20 metafasi e in cui la FISH risultava essere positiva nell'1-1.5% di cellule osservate e quindi solo leggermente superiore al cut-off di falsa positività.

Correlando i risultati di FISH con quelli in RQ-PCR risultava, dallo studio di correlazione compiuto con il test di Pearson ($r^2=0.72$, $p<0.0001$; $y=0.2202x+0.1323$), che vi era una apprezzabile corrispondenza tra la percentuale del rapporto BCR-ABL/c-ABL e la percentuale di nuclei BCR-ABL (Fig.14).

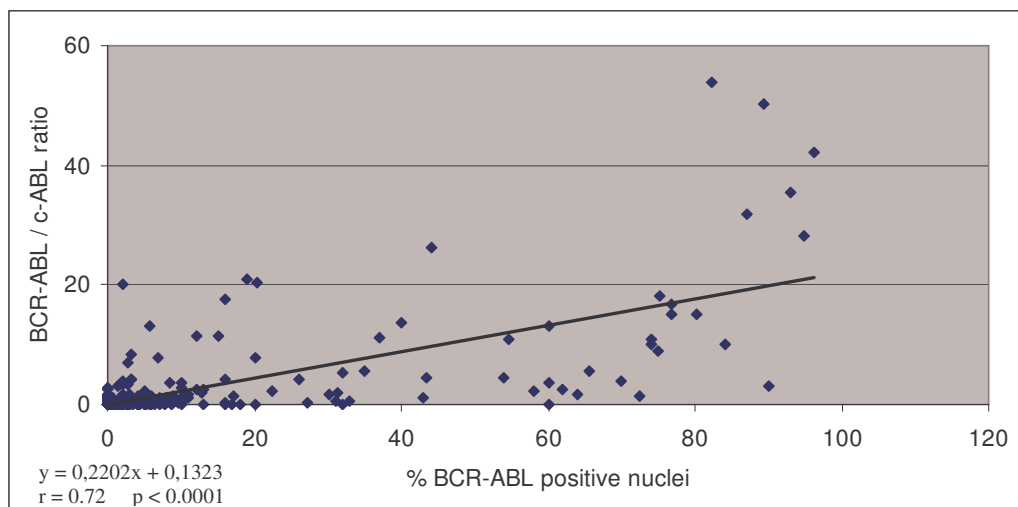


Figura 14: Correlazione tra le analisi molecolari in RQ-PCR e analisi citogenetica in FISH.

Al fine di evidenziare la differente sensibilità tra le metodiche era opportuno valutare anche la distribuzione dei casi con RQ-PCR diversa dalla RMolM (Tab.4).

		FISH			
	N° studi	<1 %	1-5 %	5.1-20 %	> 20%
non RMolM in RQ-PCR	371	215 (58%)	65 (17.5%)	44 (11.9%)	47 (12.6%)

		CC			
	N° studi	<1 %	1-5 %	5.1-20 %	> 20%
non RMolM in RQ-PCR	371	265 (71.4%)	61 (16.4%)	30 (8.1%)	15 (4.1%)

Tabella 4: Distribuzione dei casi non in RMolM rispetto alla FISH e alla CC.

Abbiamo già riferito come dei 665 studi valutabili contemporaneamente in CC e in FISH, 631 (94.8%) risultavano essere valutabili anche in RQ-PCR su cellule di sangue periferico. Di questi, 371 casi (58.2%) mostravano una quantità di trascritto BCR-ABL superiore alla quantità richiesta per la definizione di RMolM. Valutando la distribuzione di questi studi rispetto alla FISH, 215 (58%) risultavano essere negativi e 156 (42%) presentavano differenti percentuali di cellule con riarrangiamento BCR-ABL.

Valutando gli stessi 371 studi rispetto, invece, alla CC, 265 (71.4%) non presentavano metafasi Ph positive.

Pertanto questi 371 casi mostravano un'ulteriore evidenza di come la RQ-PCR sia più sensibile rispetto alla CC e alla FISH. Infatti solo il 42% e il 28.6% non in RMolM, mostrava cellule positive per il riarrangiamento BCR-ABL, rispettivamente in FISH e CC.

5. DISCUSSIONE

Il ruolo del riarrangiamento BCR-ABL nello sviluppo e nella patogenesi della LMC è ormai ben documentato. Infatti, la formazione della proteina tirosinchinasi BCR-ABL ha un ruolo fondamentale nella patogenesi della LMC, poiché è in grado di influenzare eventi biologici quali proliferazione cellulare, arresto dell'apoptosi e diminuzione dell'adesione cellulare.

Durante la fase cronica di LMC, il cromosoma Ph è, nella maggioranza dei casi, la sola anomalia citogenetica. Risultati di studi clinici hanno rilevato che la terapia con Imatinib induce una remissione ematologica nei pazienti con LMC, anche nei casi in FC per i quali una precedente terapia con IFN- α non aveva avuto successo o era stata limitata per intolleranza (45).

La risposta citogenetica si osservava precocemente durante la somministrazione di Imatinib, in molti casi entro il 3° o 6° mese dall'inizio della terapia. Molti studi indicano la risposta citogenetica a 3 mesi come un utile marker prognostico (52, 64).

Negli stadi avanzati della malattia, il clone Ph positivo, nella maggior parte dei casi, può acquisire ulteriori alterazioni citogenetiche e/o molecolari, che, nel loro insieme, vengono definite con il termine di evoluzione clonale, determinando una malattia più aggressiva. La comparsa di evoluzione clonale, normalmente, viene considerata come uno dei fattori avversi in termini di sopravvivenza (65).

Al fine di valutare la quantità residua di cellule alterate in pazienti con LMC in corso di terapia, e di conseguenza la risposta al trattamento, si possono usare metodiche diverse tra loro che si distinguono sulla base della valutazione di differenti parametri. La CC permette di analizzare solo cellule in metafase, e si

basa sull'osservazione dell'intero cariotipo; da questo tipo di indagine possono essere evidenziate alterazioni citogenetiche addizionali che con altre metodologie potrebbero non essere individuate. La FISH permette la visione della popolazione cellulare totale, in quanto analizza anche nuclei interfascici, inoltre permette la caratterizzazione del riarrangiamento BCR-ABL, in termini di eventuali amplificazioni, delezioni e varianti della traslocazione classica. La RQ-PCR misura la quantità di trascritto BCR-ABL e quindi è dipendente dalla capacità trascrizionale della tirosinchinasi.

Tutte le metodologie utilizzate dovrebbero necessariamente essere specifiche e sensibili, per l'utilizzo nella normale pratica clinico-terapeutica.

Non vi sono ancora definizioni condivise, standardizzate e validate della risposta citogenetica, basate sui dati di FISH. In particolare, la negatività in FISH può variare da meno dell'1% al 5% e ciò può dipendere dai tipi di sonda e dalle metodologie utilizzati nei differenti laboratori.

Attualmente la risposta alla terapia è universalmente determinata sulla base dei risultati di CC. Lo scopo di questo lavoro è stato principalmente quello di correlare i risultati ottenuti dalla CC con quelli ottenuti dalla FISH, al fine di poter utilizzare questa seconda come metodo di indagine più veloce e più sensibile nel monitoraggio della risposta alla terapia.

Nell'analisi di FISH il cut-off di falsi positivi per la presenza di riarrangiamento BCR-ABL era considerato essere 1%. Quindi, i casi in cui la percentuale di cellule BCR-ABL positiva era inferiore all'1% venivano considerati negativi per la presenza di tale riarrangiamento.

La Risposta Citogenetica alla terapia presentava una distribuzione in diversi intervalli di positività in FISH; questo è dovuto oltre che alla diversa sensibilità della metodica, anche al fatto che la FISH è fortemente influenzata dal tipo di sonda che viene utilizzata e dall'operatore che compie l'analisi.

Sulla base di queste premesse il GIMEMA CML WP ha disegnato tre protocolli muticentrici, dove sono stati arruolati 567 pazienti trattati con Imatinib alla

diagnosi. Questi sono stati studiati alla diagnosi e quindi monitorati per 12 mesi con analisi di CC, FISH e RQ-PCR. Le indagini di CC e FISH sono state compiute su cellule di midollo osseo, mentre quelle di RQ-PCR su cellule di sangue periferico. La centralizzazione dei risultati è avvenuta nell'Istituto di Ematologia e Oncologia Medica "L. e A. Seragnoli" di Bologna.

Dei 1090 studi compiuti in corso di terapia 665 sono risultati valutabili e utilizzati per la nostra indagine.

La stretta correlazione tra i risultati ottenuti in CC e in FISH è già stata dimostrata in letteratura (66-71). I nostri studi confermano lo stesso risultato, evidenziando una forte correlazione tra le due metodiche ($r=0.89$; $p<0.0001$) (Fig.13).

L'analisi compiuta in CC, come descritto precedentemente, è considerata tuttora la metodica di elezione al fine di valutare la diagnosi e la risposta alla terapia. I nostri studi confermano il ruolo fondamentale di una buona citogenetica convenzionale nel caratterizzare il monitoraggio della risposta alla terapia.

Il trattamento con Imatinib rispetto alle terapie precedenti risulta più efficace, in quanto determina un aumento della percentuale di pazienti che raggiungono la RCgC. A questo proposito, la CC è in grado di valutare la RCgC, ma viene considerata una metodologia poco sensibile in quanto non permette la valutazione di eventuale presenza di malattia minima residua, proprio perché è basata sull'osservazione delle sole metafasi, quindi unicamente delle cellule, che nel momento dell'analisi, erano in mitosi.

A differenza della CC, la FISH, analizzando anche cellule in interfase, può essere un valido metodo di indagine alternativo e più sensibile nella valutazione di cellule Ph positive presenti, in corso di terapia, in bassa quantità.

Infatti dallo studio è emerso che nel 17.3% degli studi in RCgC la FISH riusciva ad evidenziare la presenza di cellule BCR-ABL positive, in particolare nel 15.7% di casi analizzati in CC su almeno 20 metafasi e il 22.1% dei casi

analizzati con un numero inferiore di metafasi. Comunque, queste differenze di percentuali non sono significative (Tab. 2). Tali dati confermano la maggior sensibilità della FISH rispetto alla CC già riportata in precedenti studi. Questo ovviamente non sorprende in quanto la sensibilità maggiore dipende dalla potenzialità della FISH di analizzare un numero maggiore di cellule (per ogni controllo ne vengono valutate in media 300) rispetto alla CC che analizza solo 20-30 metafasi.

D'altra parte, 7 casi in Risposta Citogenetica Parziale (RCgP) hanno presentato valori di FISH <1%, quindi da considerare negativi per la presenza di cellule con riarrangiamento BCR-ABL. Questa discrepanza può essere ricondotta al basso numero di metafasi Ph positive valutate in questi 7 casi (1 o 2 su 20 o 30 metafasi totali analizzate) e alla presenza comunque di una bassa percentuale di riarrangiamento BCR-ABL in FISH (0.3% - 0.9%) in 5 casi; bisogna, inoltre, notare come nei rimanenti due casi non era osservata nessuna cellula BCR-ABL positiva.

Poichè per valutare la malattia minima residua si usano principalmente analisi di biologia molecolare, abbiamo cercato di correlare i risultati di FISH a quelli ottenuti da studi di RQ-PCR. Molti lavori evidenziano una significativa correlazione tra FISH e i livelli di trascritto di BCR-ABL (66, 69,70).

Nel nostro studio l'indagine di CC e FISH è stata compiuta su cellule di midollo osseo, mentre la RQ-PCR su cellule di sangue periferico, ma, come mostrato in figura 14, era evidente un'apprezzabile correlazione tra i risultati di FISH e RQ-PCR ($r=0.72$; $p<0.0001$), ma non così stretta come quella osservata tra i risultati di CC e FISH.

Probabilmente questo potrebbe essere dovuto alla diversa sorgente dei prelievi: midollo osseo e sangue periferico.

Inoltre è da notare che mentre le analisi di biologia molecolare erano centralizzate e distribuite su tre laboratori nazionali (Bologna, Napoli e Torino),

le analisi di CC e di FISH erano per lo più eseguite per uno stesso caso, nello stesso laboratorio e dagli stessi operatori.

Le nostre analisi confermano che la RQ-PCR è un metodo di indagine senz'altro molto più sensibile rispetto alla CC e alla FISH, e pertanto viene ritenuto il metodo migliore per valutare la malattia minima residua dopo trattamento con Imatinib (Tab.3). Infatti valutando la distribuzione dei 371 studi compiuti che presentavano una RM inferiore alla RMolM solo il 42% e il 28.6% mostravano cellule positive per il riarrangiamento rispettivamente in FISH e in CC (Tab. 4).

I tre metodi sono comunque da considerarsi validamente applicabili per la valutazione della risposta clinica al trattamento con Imatinib. La tecnica di PCR si basa sull'amplificazione del trascritto proporzionale alla quantità di quello presente nel campione: risulta, pertanto, una tecnica più sensibile.

Nonostante la scarsa sensibilità la CC può ancora essere considerata essenziale per la valutazione della risposta e inoltre permette di valutare l'eventuale presenza di alterazioni addizionali in cloni Ph positivi, ed è fondamentale al fine di valutare nei cloni Ph negativi le anomalie associate a mielodisplasie che possono insorgere durante la terapia con Imatinib, e il cui significato clinico non è ancora chiaro (75-77).

La FISH, quindi, si presenta come una metodica sensibile per monitorare la RCgC una volta che questa è stata raggiunta. Il nostro studio conferma la possibile flessibilità nel monitorare in CC e in FISH la risposta all'Imatinib nei pazienti con diagnosi di LMC. La FISH può essere utilizzata, insieme alla CC, per una migliore definizione di categorie citogenetiche di risposta.

E' importante comunque che l'indagine di FISH sia compiuta anche alla diagnosi. Infatti tale tecnica permette di evidenziare traslocazioni criptiche e delezioni criptiche riguardanti i derivativi dei cromosomi 9 e 22 e l'amplificazione del riarrangiamento BCR-ABL, che non possono essere osservati con indagini di CC.

Poiché la RQ-PCR viene eseguita su cellule di sangue periferico anche la FISH potrebbe essere eseguita sulla medesima tipologia di prelievo, al fine di migliorare il “management” del paziente, in quanto notevolmente meno invasivo del prelievo di midollo osseo.

Alcuni studi in letteratura avvalorano la possibilità di utilizzare le cellule del sangue periferico per le analisi in FISH, evidenziando una buona correlazione con l’indagine di CC eseguita su cellule di midollo. Altri studi ne descrivono, invece, differenza sia tra i due metodi nello stesso paziente, sia tra diversi studi; quindi sono opportune ulteriori analisi al fine di stabilire una corretta correlazione tra la CC eseguita su cellule di midollo osseo e la FISH eseguita su cellule di sangue periferico.

Le analisi di CC eseguite su midollo osseo non possono essere comunque abbandonate, poiché la perdita o il non raggiungimento della RCgC è tuttora valutata universalmente con l’analisi del cariotipo, anche al fine di valutare l’eventuale comparsa di cloni con alterazioni addizionali. Infatti, anche se l’evoluzione clonale non è necessariamente associata all’immediata progressione della malattia, può però essere indicativa di una malattia avanzata che risulta essere meno responsiva all’Imatinib e che può dipendere dal tipo di alterazione addizionale presente e quindi dal tipo di anomalia molecolare che può dare origine ad una forma di resistenza all’Imatinib.

Quindi un paziente che non ha raggiunto o ha perso la RCgC deve essere sempre monitorato con le analisi di CC eseguite su cellule di midollo osseo. Ne consegue che chi risponde stabilmente da un punto di vista citogenetico e molecolare, mantiene un cariotipo normale a livello midollare. Questi pazienti potrebbero essere monitorati con analisi in RQ-PCR e/o FISH eseguite su cellule di sangue periferico a meno che non compaiano citopenie o displasie come suggerito da indagini di laboratorio.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S. – *Lezioni di Ematologia* – Esculapio Editore, 2003, 222-230.
2. Cortes J.E., Talpaz M., Kantarjian H. – *Chronic myeloid leukemia: a review* – British Journal of Hematology 76: 27-32.
3. Nowell P.C., Hungerford D.A. – *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.* – Science 1960; 132: 1497.
4. Rowley J.D. – *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia indentified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining* – Nature 1973; 243: 290-293.
5. Walz C., Sattler M. – *Novel target therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML)* – Oncology Hematology 2006; 57 (2): 145-64
6. Advani A.S., Pendergast A.M. – *Bcr-Abl variants: biological and clinical aspects* – Leukemia Research 2002; 26: 713-720.
7. Neves H, Ramos C, da Silva MG, et al. - *The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation* - Blood. 1999;93:1197-207.
8. Pendergast AM. - *BCR-ABL protein domain function and signaling. In: Carella et al. Chronic Myeloid Leukemia: biology and treatment* - Dunitz Ed; 2001: 19-39.
9. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. - *The molecular biology of chronic myeloid leukemia.* - Blood. 2000;96:3343-56.
10. McWhirter JR, Wang JY. - *An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias* - EMBO J. 1993;12:1533-46.

11. Bathia R, Verfaillie C. - *Abnormalities in hemopoietic progenitor adhesion. In: Carella et al. Chronic Myeloid - Leukemia: biology and treatment. Dunitz Ed; 2001:41-54*
12. Pierce A, Spooncer E, Wooley S, et al. - *Bcr-Abl protein tyrosine kinase activity induces a loss of p53 protein that mediates a delay in myeloid differentiation - Oncogene. 2000 Nov 16;19(48):5487-97*
13. Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. - *Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression - Leukemia. 2002;16:1402-11.*
14. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, et al. - *Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis - Oncologist. 2000;5:405-15.*
15. Gambacorti-Passerini C, le Coutre P, Mologni L, et al. - *Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR-ABL+ leukemic cells and induces apoptosis - Blood Cells Mol Dis. 1997;23:380-94.*
16. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, et al. - *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products - Science. 1990 Mar 2;247(4946):1079-82.*
17. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. - *Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 BCR-ABL gene of the Philadelphia chromosome - Science 1990; 247:824-30.*
18. Naumann S., Decker H.J. - *Genesis of variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelogenous leukemia - Cancer Genetics and Cytogenetics 2003, 147: 18-22.*
19. Mitelman F. - *The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia - Leukemia and lymphoma, 11: 11-15.*

20. Zaccaria A. , Testoni N., Tassinari A. et al. – *Cytogenetic and molecular studies in patients with chronic myeloid leukemia and variant Ph translocations* – Cancer Genetics and Cytogenetics 1989; 42: 191-202.
21. Johansson B., Fioretos T., Mitelman F. – *Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia* – Acta Haematologica 2002, 107: 76-94.
22. Kantarjian H.M., Keating M.J., Talpaz M. et al. – *Chronic myelogenous leukemia in blast crisis* – American Journal of Medicine 1987; 83:445-454.
23. Anastasi J., Feng J., Le Beau M.M. et al. – *The relationship between secondary chromosomal abnormalities and blast transformation in chronic myelogenous leukemia* – Leukemia 1995; 9:628-633.
24. Buckner C.D., Thomas E.D. et al. – *Marrow transplantation for patients in accelerated phase of chronic myeloid leukemia* – Blood 1994; 84: 4368-73.
25. Kantarjian H.M., Keating M.J., Estey E.H. et al – *Treatment of advanced stages of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and low-dose cytarabine* – Clin. Oncol. 1992; 10: 772-8.
26. Cortes J., Talpaz M., O'Brien S. et al – *Suppression of cytogenetic clonal evolution with interferon-alpha therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia* – Clin. Oncol. 1998; 16: 3279-85.
27. O'Dwyer M., Mauro M., Capdeville R. – *The impact of clonal evolution on response to imatinb mesylate (STI571) in accelerated phase CML* – Blood 2002; 100: 1628-1633.
28. Deininger M. – *Cytogenetic Studies in Patients on Imatinib* – Seminars in Hematology 2003, 40 (suppl 2): 50-55.
29. Cortes J., O'Dwyer M.E. – *Clonal evolution in chronic myelogenous leukemia* – Hematol. Oncol. Clin. N. Am. 2004; 18: 671-684.

30. Mohamed A.N., Pemberton P., Zonder J., Schiffer C.A. – *The effect of imatinib mesylate on patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia with secondary chromosomal aberrations* – Clinical Center Research 2003; 9: 1333-1337.
31. Tchirkov A., et al. – *Interphase cytogenetics and competitive RT-PCR for residual disease monitoring in patients with chronic myeloid leukaemia during interferon- α therapy* – British J. H. 1998; 101: 552-557.
32. Specchia G., Albano F., Anelli L., Greco G. et al. – *Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia are associated with loss of tumor suppressor genes* – Leukemia and lymphoma 2003; 1-5.
33. O'Brien S., Thall P., Siciliano M.J. – *Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia* – Bailliere's Clinical Haematology 1997; 10: 259-272.
34. Gratwohl A., Hermans J, Goldman JM, et al. - *Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* - Lancet. 1998; 352: 1087-1092.
35. Passweg JR, Walker I, Sobocinski KA, et al. - *Validation and extension of the EBMT Risk Score for patients with chronic myeloid leukaemia receiving allogeneic haematopoietic stem cell transplants.* - Br J Haematol. 2004;125: 613-620.
36. Crawley C, Szydlo R, Lalancette M, et al. - *Outcomes of reduced-intensity transplantation for chronic myeloid leukemia: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukemia Working Party of the EBMT* - Blood. 2005; 106: 2969-2976.
37. Allan NC, Richards SM, Shepherd PC. - *UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon- α n1 for*

- chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response* Lancet. 1995;345:1392-7.
38. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. - *Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia* - N Engl J Med. 1994;330:820-5.
 39. Hehlmann R, Heimpel H, Hasford J, et al. - *Randomized comparison of interferon alfa with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia* - Blood. 1994;84:4064-77.
 40. Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia and Italian Group for Bone Marrow Transplantation. - *Monitoring treatment and survival in chronic myeloid leukemia* - J Clin Oncol. 1999;17:1858-68.
 41. Bonifazi F, de Vivo A, Rosti G, et al. - *Chronic myeloid leukemia and Interferon α : a study of complete cytogenetic responder* - Blood. 2001;98:3074-81.
 42. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, et al. - *Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia* - N Engl J Med. 1997;337:223-9.
 43. Baccarani M, Rosti G, de Vivo A, et al. - *A randomized study of interferon-alfa versus interferon-alfa and low-dose arabinosyl cytosine in chronic myeloid leukemia* - Blood. 2002;99:1527-35.
 44. Capdeville R., et al. - *Glivec (STI571, Imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug* - Nature Reviews, Drug Discovery July 2002; 1:493-502.
 45. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. - *Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells* - Nature Med. 1996;2:561-6.

46. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. - *Inhibition of the Abl Protein-tyrosine Kinase in vitro and in vivo by a 2-Phenylaminopyrimidine derivative* - Cancer Res. 1996;56:100-4.
47. Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, Luthra R, Giles F, Verstovsek S, Faderl S, Thomas D, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Jones D, Talpaz M. - *Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon- α* . - Blood 2004;104:1979-88
48. Baccarani M, Pane F, Saglio G. - *Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia*. - Haematologica 2008; 93: 161-166.
49. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. - *Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia*. - N Engl J Med 2006;355:2408-17.
50. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. - *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. - N Engl J Med. 2001;344:1031-7.
51. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. - *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome*. - N Engl J Med. 2001; 344:1038-42.
52. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. - *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia*. - N Engl J Med. 2002; 346:645-52.
53. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. - *Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study*. - Blood. 2002; 99:3530-9.

54. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. - *Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study.* - Blood. 2002; 99:1928-37.
55. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, et al. - *Treatment of Philadelphia Chromosome-positive, Accelerated-phase Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib Mesylate.* - Clin Cancer Res. 2002; 8:2167-76.
56. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. - *Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia.* - N Engl J Med. 2003;348:994-1004.
57. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. - *Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.* - N Engl J Med. 2003;349:1423-1432.
58. Iacobucci I, Saglio G, Rosti G, Testoni N, Pane F, Amabile M, et al. - *GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. Achieving a major molecular response at the time of a complete cytogenetic response (CCgR) predicts a better duration of CCgR in imatinib-treated chronic myeloid leukemia patients.* - Clin Cancer Res 2006;12:3037-42
59. Gabert J, Beillard E, van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. - *Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program.* - Leukemia 2003;17:2318-57.
60. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al. - *Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-*

- time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects.* - Leukemia. 2003;17:1013-1034.
61. van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. - *Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia.* -Leukemia. 1999;13:1901-28.
 62. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, et al. - *Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results.* - Blood. 2006;108:28-37.
 63. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. - *Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet.* - Blood. 2006; 108:1809-20.
 64. Rosti G., Testoni N., Martinelli G., Baccarani M. – *The cytologic response as a surrogate marker of survival* – Seminars in Hematology 2003; 40 (suppl. 2): 56-61.
 65. Kantarjian H.M., Cortes J., O'Brien S. et al – *Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase* – Blood 2002; 99: 3547-3553.
 66. Schoch C, Schnittger C, Bursch S, Gerstner D, Hockhaus A, Berger U, Hehlmann R, Hiddemann W, Haferlach T - *Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases* - Leukemia 2002, 16:53-55

67. Cuneo A, Bigoni R, Emmanuel B, Smit E, Rigolin GM, Roberti MG, Bardi A, Piva N, Scapoli G, Castoldi G, Van Den Berghe H, Hagemeijer A. - *Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis.* - Leukemia 1998; 12: 1718-1723
68. Muhlmann J, Thaler J, Hilbe W, Bechter O, Erdel M, Utermann G, Duba HC. - *Fluorescence in situ hybridization (FISH) on peripheral blood smears for monitoring Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (CML) during interferon treatment: a new strategy for remission assessment.* - Genes Chromosomes Cancer 1998; 21: 90-100.
69. Lesser M, Dewald GW, Sison CP, Silver RT. - *Correlation of three methods of measuring cytogenetic response in chronic myelocytic leukemia.* - Cancer Genet Cytogen 2002; 137:79-84.
70. Raanani P, Ben-Bassat I, Gan S, Trakhtenbrot L, Mark Z, Ashur-Fabian O, et al. - *Assessment of the response to imatinib in chronic myeloid leukemia patients: comparison between the FISH, multiplex and RT-PCR methods.* - Eur J Haematol 2004; 73:243-50.
71. Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, Tobita T, Yano K, Kobayashi M, et al. - *Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells.* - Leukemia 1999; 13: 542-552.
72. Iacobucci I, Galletti L, Amabile M, Soverini S, Baccarani M, Martinelli G. - *Monitoring BCR-ABL transcript levels by real-time quantitative polymerase chain reaction: a linear regression equation to convert from BCR-ABL/B2M ratio to estimated BCR-ABL/ABL ratio.* - Haematologica 2007;92:429-430
73. Emig M, Saussele S, Wittor H, Weissner A, Reiter A, Willer A, et al. - *Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using*

- specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia* 1999;13:1825-32.
74. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. - *Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe Against Cancer Program.* - *Leukemia* 2003;17:2474-86.
 75. Navarro JT, Feliu E, Grau J, Espinet B, Colomer D, Ribera JM, et al. - *Monosomy 7 with severe myelodysplasia developing during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: two cases with a different outcome.* - *Am J Hematol* 2007;82:849-51.
 76. Abruzzese E, Gozzetti A, Galimberti S, Trawinska MM, Caravita T, Siniscalchi A, et al. - *Characterization of Ph-negative abnormal clones emerging during imatinib therapy.* - *Cancer* 2007;109:2466-72.
 77. Deininger MW, Cortes J, Paquette R, Park B, Hochhaus A, Baccarani M, et al. - *The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells.* - *Cancer* 2007;110:1509-19.
 78. Mark HFL, Sokolic RA, Mark Y. - *Conventional cytogenetics and FISH in the detection of BCR-ABL fusion in chronic myeloid leukemia (CML) .-* *Experimental and molecular pathology* 2006; 81: 1-7.
 79. Ross DM, Branford S, Moore S, Hughes TP. - *Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL.* - *Leukemia* 2006; 20:664-70.
 80. Reinhold U, Henning E, Leiblein S, Niederwieser D, Deininger MWN. - *FISH for BCR-ABL on interphases of peripheral blood neutrophils but not of unselected white bone marrow cytogenetics in CML patients treated with imatinib.* - *Leukemia* 2003; 17:1925-1929